



**THAYANNA SCOPEL PEREIRA**

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, PERFIL QUÍMICO E  
SENSORIAL DE CAFÉS FERMENTADOS EM  
BIORREACTORES**

**LAVRAS-MG**

**2020**

**THAYANNA SCOPEL PEREIRA**

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, PERFIL QUÍMICO E SENSORIAL DE CAFÉS  
FERMENTADOS EM BIORREATORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Nádia Nara Batista  
Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Thayanna Scopel.

Aspectos microbiológicos, perfil químico e sensorial de cafés  
fermentados em biorreatores / Thayanna Scopel Pereira. - 2020.  
89 p.

Orientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Coorientador(a): Nádia Nara Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Café. 2. Fermentação. 3. Microbiologia. I. Schwan, Rosane  
Freitas. II. Batista, Nádia Nara. III. Título.

**THAYANNA SCOPEL PEREIRA**

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, PERFIL QUÍMICO E SENSORIAL DE CAFÉS  
FERMENTADOS EM BIORREATORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de março de 2020.

Dra. Cristina F. Silva e Batista	UFLA
Dra. Nadia Nara Batista	UFLA
Dr. Diego Egídio Ribeiro	Syngenta
Dr. João Batista Pavesi Simão	IFES

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Nádia Nara Batista  
Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2020**

*DEDICO À DEUS*

*Meus pais, Josiani e Roberto, pelo apoio, incentivo, carinho, por tornarem este sonho possível.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Deus, pelas bênçãos recebidas, por iluminar os meus caminhos e pelos obstáculos superados nesta etapa.

Aos meus pais, Josiani e Roberto, pela confiança, orações, ensinamentos, amizade e suporte em todos os momentos, tornando a minha vida acadêmica mais leve.

Aos meus irmãos, Marianna e Vinícius, por estarem sempre presentes e torcendo pela realização dos meus objetivos.

Às minhas tias, que são modelos de determinação e são exemplos a serem seguidos;

À professora Dra Rosane Schwan, pela orientação, oportunidade de fazer parte deste projeto em seu grupo de pesquisa, pela confiança e por todos os ensinamentos compartilhados.

À Dra Nádia Batista, pela coorientação, apoio e ensinamentos. E à Dra Luciana Ribeiro, pela disponibilidade e suporte durante a pesquisa.

A todos os amigos e colegas de laboratório, pelo convívio, paciência, parceria, boa vontade, momentos de descontração e todo o apoio concedido.

À professora Dra Lúcia Pimenta, do departamento de química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por me receber em seu laboratório, pelos conhecimentos compartilhados e pela disponibilidade.

À Universidade Federal de Lavras e aos professores, funcionários do Departamentos de Biologia, pelas contribuições e todos os ensinamentos transmitidos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

E a todos que de alguma forma contribuíram e/ou torceram pela concretização desse trabalho.

Minha sincera gratidão!

## RESUMO GERAL

O café é uma das *commodities* mais negociadas em todo o mundo e apresenta grande importância econômica no Brasil, principal produtor e exportador mundial. No setor cafeeiro, a pós-colheita do café é relevante por conferir impactos significativos na qualidade química e sensorial da bebida. Nesta etapa, o processo de fermentação ocorre de forma espontânea, através dos microrganismos presentes no fruto e no ambiente. No entanto, devido à falta de controle e padronização da qualidade, novos métodos para a condução da fermentação são necessários para a modulação do perfil sensorial da bebida final. O objetivo da pesquisa foi investigar a diversidade microbiana em diferentes fermentações utilizando a mesma metodologia, avaliar o perfil químico e sensorial de cafés fermentados em biorreatores, em diferentes regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Brasil. Duas cidades no Sul de Minas (Carmo de Minas e Três Pontas), uma em Matas de Minas (Lajinha) e outra no Cerrado (Monte Carmelo). Dois processos foram realizados, café natural e café descascado (CD). A população de bactérias e leveduras foram avaliadas por plaqueamento em superfície. Os compostos químicos foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ ). A análise sensorial foi conduzida pelo método TDS (*Temporal Dominance of Sensations*). Houve diferença significativa na contagem populacional entre os diferentes tempos e entre os processamentos. A região Sul de Minas apresentou contagens superiores durante a fermentação. As leveduras *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, foram detectadas apenas nas cidades de Carmo de Minas (CM), Três Pontas (TP) e Lajinha (LAJ), respectivamente. Em Monte Carmelo (MC), *Saccharomyces cerevisiae* foi detectada em maior abundância. As bactérias *Zymomonas mobilis* e *Leuconostoc lactis* foram detectadas somente em CM. *Acinetobacter johnsonii*, *A. oryzae* e *Enterobacter cloacae* foram detectadas apenas em TP. *Enterobacter hormaechei* foi detectada apenas em LAJ. *Bacillus cereus* em MC. A composição química e o perfil sensorial foram influenciados pela alteração da forma de fermentação. A RMN de  $^1\text{H}$ , juntamente com a análise de componentes principais (PCA), mostraram agrupamento entre os cafés fermentados em biorreatores e o controle. As curvas de TDS variaram de acordo com a região e com o tipo de processamento pós-colheita realizado. Dentre as cidades estudadas, no café natural em MC e no CD em LAJ, os atributos caramelo e chocolate foram dominantes e específicas, respectivamente. Os atributos caramelo e amadeirado foram detectados apenas em MC, no café natural e café descascado, respectivamente. A dominância do atributo frutado foi comum em LAJ no café natural e em CM e TP no café descascado. A condução da fermentação em batelada, em ambiente fechado, com limitação de oxigênio e anaerobiose induzida pela microbiota epifítica, afetou a microbiota e alterou a composição química e sensorial. A microbiota apresentou comportamento diferente nas distintas variedades. A diversidade em cada fazenda indicou uma microbiota específica para a região geográfica e influenciou os sabores. Os cafés fermentados em biorreatores apresentaram mais compostos químicos precursores de sabores e aromas, e foram correlacionados ao café verde, e mais atributos sensoriais foram percebidos em relação ao controle.

**Palavras-chave:** Sistema fechado. Indução à anaerobiose. Microbiota.

## GENERAL ABSTRACT

The coffee is one of the most appreciated commodities worldwide, bearing great economic importance in Brazil, the main world producer, and exporter. In the coffee sector, coffee post-harvesting is relevant, once it grants significant impacts, both on the chemical and sensory quality of the beverage. At this stage, the fermentation process takes place, spontaneously, due to microorganisms present in the fruit as well, as in the environment. However, due to the lack of control, new methods for conducting fermentation are necessary for modulation of the sensory profile of the final beverage. The research aimed to investigate the microbial diversity in different fermentations, using the same methodology, chemical, and sensory profiles of fermented coffees, in bioreactors, in three producing regions of Minas Gerais, Brazil. Two cities in Sul de Minas (Carmo de Minas and Três Pontas), one in Matas de Minas (Lajinha), and another one in the Cerrado (Monte Carmelo). Two processes were carried out, natural coffee beans and pulped coffee (PC). The population of bacteria was evaluated by surface plating. The chemical compounds were analyzed through Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  NMR). The sensory analysis were conducted by TDS (Temporal Dominance of Sensations). There was a significant difference in population scoring between different times and between. The South de Minas region had higher count during the fermentation. *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulasporea delbrueckii*, and *Pichia kluyvei* yeast were detected only in the cities of Carmo de Minas (CM), Três Pontas (TP), Lajinha (LAJ), respectively. In Monte Carmelo (MC), *Saccharomyces cerevisiae* was detected in vast abundance. The bacterias *Zymomonas mobilis* and *Leuconostoc lactis* were detected only in CM. *Acinetobacter johnsonii* and *Enterobacter cloacae* were detected only in the TP region. *Enterobacter hormaechei* was detected only in LAJ. *Bacillus cereus* only in MC. *Hanseniaspora uvarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Weissella cibaria* were detected in all the regions. The chemical composition and the sensory profile were influenced, as the fermentation process changed. The  $^1\text{H}$  NMR, along with the principal component analysis (PCA), allowed the separation between the green coffee beans fermented in bioreactors and control. The TDS curves varied with the region and the type of post-harvest processing performed. Among the cities studied, in natural coffee in the MC, and the pulped coffee in LAJ, caramel and chocolate attributes were dominant and specific, respectively. The caramel and woody attributes were detected only in MC, in natural coffee, and pulped coffee, respectively. The dominance of the fruity attribute was typical in LAJ, in the natural coffee and in CM and TP in the pulped coffee. The conduction of batch fermentation, closed environment, with oxygen limitation and anaerobiosis, induced by epiphytic microbiota, affected the microbiota and altered the chemical and sensory composition. The microbiota presented different behavior in different varieties. The diversity in each farm indicated a specific microbiota for the geographic region and influenced the flavors. The coffees fermented in bioreactors presented more chemical compounds precursors of flavors, and aromas were correlated with green coffee, and more sensory attributes were perceived to control.

**Keywords:** System closed. Induction to anaerobiosis. Microbiota.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Regiões produtoras de café no Brasil. ....	17
Figura 2 - Esquema do fruto do café. ....	19
Figura 3 - Representação de níveis de energia para hidrogênio em um campo magnético Bo. ....	28

### SEGUNDA PARTE

Figura 1 - Heatmap das espécies de bactérias e leveduras presentes no café.....	50
Figura 2 - Heatmap da contagem populacional (log UFC/g) das espécies de bactérias e leveduras .....	62
Figura 3 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz de cafés .....	63
Figura 4 - Gráfico de scores (A) e loadings (B) de PCA dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ DE 400 MHz de grãos verdes .....	64
Figura 5 - Gráfico de scores (A) e loadings (B) de PCA dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ DE 400 MHz de grãos torrados.....	65
Figura 6 - Curvas de Dominância Temporal das sensações (TDS) em café natural .....	66
Figura 7 - Curvas de Dominância Temporal das sensações (TDS) em café descascado .....	67

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Dados sobre a altitude, precipitação pluviométrica (por ano) e temperatura das regiões produtoras de Minas Gerais. ....	18
--	----

### SEGUNDA PARTE

Tabela 1 - Dados geográficos e ambientais das cidades de amostragem .....	50
Tabela 2 - Tempo e temperatura de fermentação em horas (h) e em (°C) .....	51
Tabela 3 - Contagem populacional (log UFC/g) de bactérias e leveduras .....	58

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>12</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Café</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Regiões produtoras de café</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Composição química e qualidade do café</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Fermentação</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Biorreator</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Microbiota presente na fermentação espontânea do café</b> .....	<b>24</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Bactérias</b> .....	<b>24</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Leveduras</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Fungos filamentosos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7</b>	<b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8</b>	<b>Análise sensorial - <i>Temporal Dominance of Sensations</i> (TDS)</b> .....	<b>29</b>
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	<b>43</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O café é a bebida mais consumida no mundo, sendo a espécie *Coffea arabica* a mais explorada economicamente (ICO, 2019). O Brasil é o principal produtor e exportador mundial, onde a produção de *C. arabica* representa cerca de 71% da produção do país (CONAB, 2019).

O sabor e aroma do café são fatores essenciais para a alta aceitabilidade e para o prazer do consumidor. Nos últimos anos, têm-se observado mudanças quanto à preferência do consumidor, ocorrendo aumento na demanda de cafés por cafés especiais (MANZO, 2014). Vários fatores influenciam a qualidade do café, como características geográficas, variedades cultivadas, práticas agrícolas, forma de processamento e torrefação (SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014). Após a colheita, o café pode ser processado pelas vias úmida, seca e semi-seca, interferindo no sabor e nos aromas característicos da bebida (BRANDO; BRANDO, 2015; ESQUÍVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Em quaisquer tipos de processamento pós-colheita podem ocorrer fermentações espontâneas (EVANGELISTA et al., 2014a; SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010). A fermentação do café ocorre de forma natural, por meio da degradação da mucilagem e da polpa. Ao metabolizar as partes constituintes do fruto, os microrganismos epífitos produzem metabólitos como ácidos orgânicos, ésteres e compostos aromáticos, implicando em alterações nas propriedades sensoriais da bebida final (EVANGELISTA et al., 2014; LEE et al., 2015; SIVETZ, 1963).

A diversidade microbiana (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) de frutos e grãos de café pode variar conforme as condições ambientais da região onde são cultivados, tais como temperatura e umidade, e também em função da população microbiana do solo e das diferentes variedades de café (SILVA et al., 2008). No entanto, estudos utilizando novas metodologias para condução do processo fermentativo, na tentativa de melhoria da qualidade do produto final, vêm sendo desenvolvidos (BRESSANI et al., 2020; BRESSANI et al., 2018; MARTINS et al., 2020).

Assim, a condução da fermentação em batelada, sistema fechado, com limitação de oxigênio e anaerobiose induzida pela microbiota epifítica, torna-se uma alternativa para conduzir o processo fermentativo, com a finalidade de maior controle e modulação do perfil sensorial da bebida final. Embora os cafés fermentados em biorreatores favorecem a qualidade da bebida final, ainda faltam dados sobre a caracterização microbiológica, perfil químico e sensorial destes cafés.

O objetivo da pesquisa foi investigar a diversidade microbiana em diferentes fermentações, utilizando a mesma metodologia, avaliar o perfil químico e sensorial de cafés fermentados em biorreatores, em diferentes regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Brasil.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Café

O café é uma das bebidas, comumente, consumida em muitos países. O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae, apresenta cerca de cento e três espécies (DAVIS et al., 2006). No entanto, *Coffea arabica* (Arábica) e *Coffea canephora* (Robusta) são as duas principais espécies de café comercialmente importantes, plantadas principalmente em países tropicais. Em termos de qualidade, o arábica se destaca por apresentar menor amargor, maior doçura e complexidade sensorial, em comparação ao robusta, que caracteriza-se pela maior concentração de cafeína, o que o torna atrativo para a industrialização de café solúvel e para o preparo de *blends* com *C. arabica* (CHALFOUN; REIS, 2010; MARTINS, 2012; MORELI, 2009; PRIVAT et al., 2008).

O *Coffea arabica*, provavelmente tem sua origem no continente africano, das terras altas da Etiópia (Cafa e Enária), de clima árido e tropical. Neste local, a princípio, o fruto foi usado para consumo. O cultivo do produto se expandiu, chegando até a península Arábica, onde desenvolveram-se técnicas de plantio e para a preparação do café. Posteriormente, a região Iêmen, no sudoeste da Ásia, foi a primeira a passar a ter as sementes deste fruto. Em 1615, os grãos de café chegaram na Venezuela para o consumo, e se difundiram pelo mundo (MARTINS, 2012; MURTHY; NAIDU, 2012).

O *Coffea canephora* é originária do Congo, na África, e os primeiros cultivos ocorreram por volta de 1900, na região ocidental, centro tropical e subtropical do continente africano, possuindo ampla distribuição geográfica (CHARRIER; BERTHAUD, 1985; MURTHY; NAIDU, 2012).

No Brasil, o café foi introduzido em 1727, no estado do Pará, por meio de mudas e sementes de *C. arabica* provenientes da Guiana Francesa, conduzido pelo sargento português Francisco Melo Palheta. Logo após, o cultivo propagou-se pelo Maranhão e para as regiões Sudeste e Sul (MARTINS, 2012; MORELI, 2009). O estado de Minas Gerais se destaca como maior produtor de café arábica, e o Espírito Santo é o principal produtor de café conilon (CONAB, 2009).

O café é uma das culturas, economicamente, mais importantes e está em segundo lugar, logo atrás do petróleo, como a *commodity* mais negociada no mercado internacional (PRIVAT et al., 2008). O consumo mundial de café atinge cerca de 165 milhões de sacas. O Brasil está entre os maiores consumidores de café com 22,2 milhões de sacas de 60 kg, ficando em segundo lugar, atrás dos Estados Unidos da América (26,5 milhões de sacas de 60 kg) (ICO, 2019). A

produção brasileira, em 2019, atingiu cerca de 48,9 milhões de sacas de 60 kg, e a estimativa do arábica é de 34,47 milhões de sacas, sendo o estado de Minas Gerais, com destaque, o maior produtor de café, totalizando 24,51 milhões de sacas (CONAB, 2019).

Na etapa pós-colheita, após a colheita dos frutos, os grãos de café são submetidos a diversos processos (ZARRINBAKSH et al., 2016). Para isso a casca, a polpa, a mucilagem e o pergaminho devem ser removidos antes, durante ou após a secagem (BORÉM, 2008), o que pode ser realizado por meio de diferentes métodos de processamento. O processamento do café é realizado, comumente, logo após a colheita (CASAS et al., 2017).

Três métodos estão envolvidos: o processamento seco, semi-seco e o processamento úmido (BRANDO; BRANDO, 2015). Esses diferentes métodos podem proporcionar sabores e aromas peculiares, permitindo ao consumidor a escolha de sua preferência (VILELA et al., 2010).

No processamento a seco, os frutos na sua forma íntegra são secos naturalmente (sol), em plataformas e/ou pátios de cimento, ou artificialmente em secadores (BEKALO; REINHARDT, 2010; VILELA et al., 2010), gerando frutos secos, chamados de café em coco ou café natural (BORÉM, 2008). O exocarpo, o mesocarpo e o endocarpo do café são removidos, obtendo-se o grão do café (BEKALO; REINHARDT, 2010). Esse processo é, comumente, realizado na maioria dos cafés arábica no Brasil, na Etiópia e no Iêmen, (SILVA et al., 2000).

O método de processamento denominado semi-seco é praticado por alguns produtores no Brasil, é também conhecido como processo natural descascado “cereja descascada” ou CD, sendo uma variação do processamento via úmida. A casca e a parte da mucilagem são extraídas do fruto mecanicamente, e os cafés são transferidos para as plataformas de secagem, até atingir o teor de 11% de umidade (BRANDO; BRANDO, 2015; VILELA et al., 2010).

O processamento úmido ocorre de diferentes formas: removendo-se a casca, mecanicamente, e a mucilagem por meio de fermentação (os grãos são submetidos à fermentação dentro de tanques com água), produzindo o café despulpado; removendo-se, mecanicamente, a casca e parte da mucilagem, resultando no café descascado, comum no Brasil; ou removendo-se, mecanicamente, a casca e a mucilagem, produzindo o café desmucilado (BORÉM, 2008; VILELA et al., 2010).

A mucilagem envolta dos grãos do café é removida pela fermentação de vinte e quatro a quarenta e oito horas, dependendo da temperatura local. Por fim, os grãos são secados ao sol ou de forma artificial, até chegar ao teor de água de 11 a 12% (LEE et al., 2015). Em lugares

como a Colômbia, América Central e Havaí utilizam o processamento via úmido para os cafés arábica (SCHWAN; WHEALS, 2003).

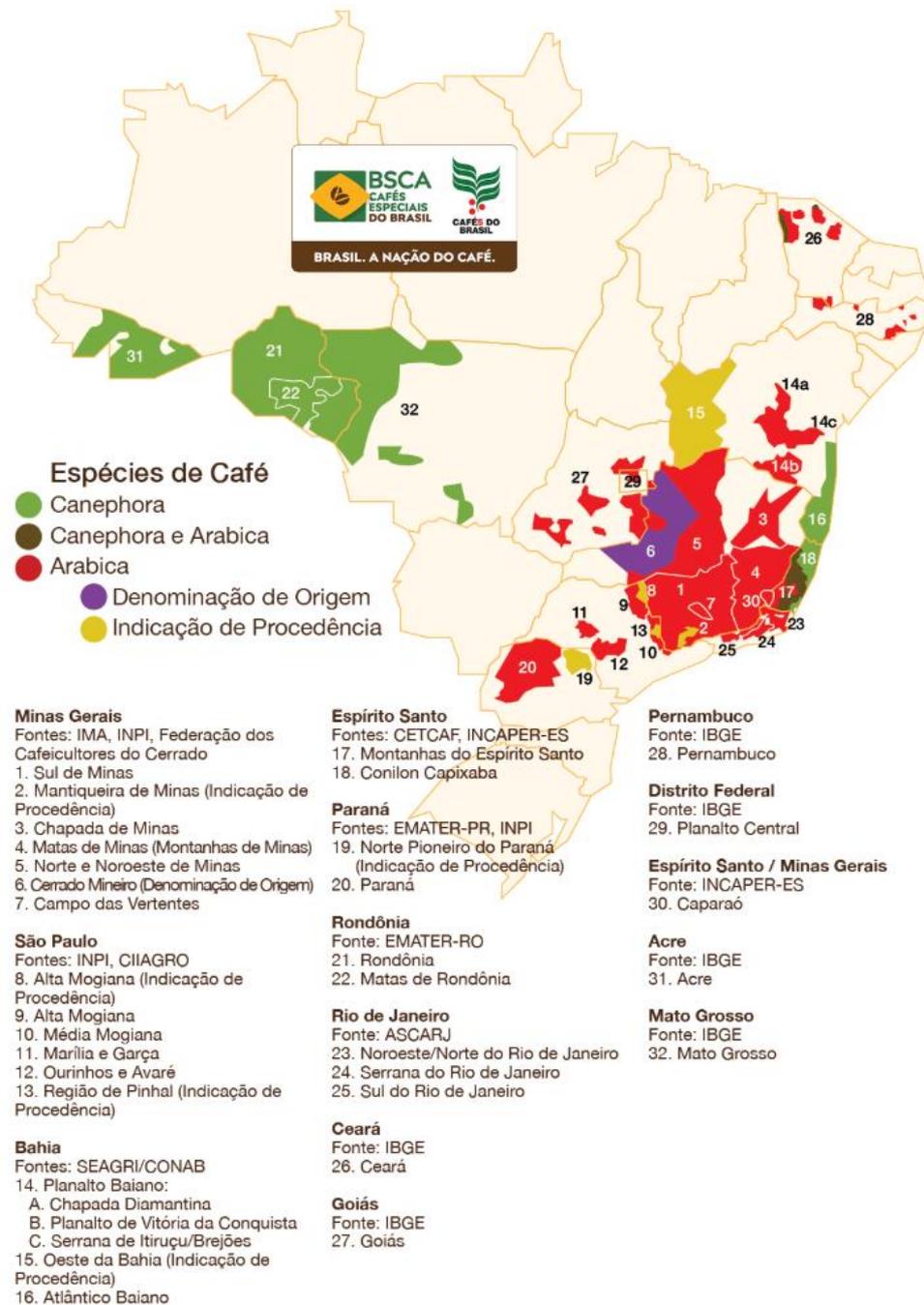
O tipo de processamento influencia diretamente a qualidade da bebida final, devido às variações nos constituintes químicos formados como a trigonelina, cafeína, carboidrato e compostos voláteis (FARAH et al., 2006). Knopp et al. (2006) compararam carboidratos nos três diferentes métodos de processamento, detectaram níveis superiores de glicose e frutose nos grãos de cafés submetidos ao processamento da via seca, caracterizado por ser mais aeróbio, ocorrendo consumo menor pelo metabolismo das sementes.

## **2.2 Regiões produtoras de café**

O Brasil possui cerca de 2,13 milhões de hectares de áreas plantadas com a cultura do café, sendo que 85% dessa área está em produção e 15% está em formação (CONAB, 2019).

Os principais estados produtores são Minas Gerais (24,51 milhões de sacas), Espírito Santo (13,4 milhões de sacas), São Paulo (4,37 milhões de sacas), Bahia (4,5 milhões de sacas), Rondônia (21 milhões), Paraná (1,1 milhão de sacas), Rio de Janeiro (346 mil de sacas) e Goiás (150,9 mil sacas). (CONAB, 2019). A produção da cultura cafeeira brasileira está distribuída em distintas regiões, (FIGURA 1) devido à variedade das condições ambientais como solos, temperaturas, climas, relevos, altitudes e latitudes (ALVES et al., 2011; BRASIL, 2016), proporciona diferentes perfis sensoriais de bebidas.

Figura 1 - Regiões produtoras de café no Brasil.



Fonte: Brazil Specialty Coffee Association (2019).

Quatro grandes regiões de Minas Gerais são consideradas como as principais produtoras de café: Sul de Minas, engloba o Centro-Oeste, no sul; Cerrado Mineiro, no ocidente; Matas de Minas, conhecida anteriormente como Zona da Mata, engloba Região Central e Rio Doce, no sudeste e Norte de Minas, também conhecida como Chapada de Minas, no norte (BARBOSA et al., 2010; CONAB, 2019). Dessas regiões, a do Sul de Minas se destaca como a maior

produtora do país, com área em formação de 155.249 hectares, 496.613 hectares em produção (CONAB, 2019). Em 2019, as regiões mais produtivas foram a do Sul de Minas e do Cerrado, que em conjunto, produziram cerca de 36,9% da produção brasileira (CONAB, 2019).

Dados de altitude, precipitação pluviométrica e temperatura estão demonstrados na Tabela 1. A temperatura do ar e as condições hídricas (umidade do ar e precipitação pluviométrica) estão entre os fatores ambientais que afetam o florescimento, desenvolvimento dos frutos e influenciam a produtividade do café (CAMARGO et al., 2010). A altitude é importante por influenciar, diretamente, nas condições climáticas. A temperatura do ar reduz à uma taxa média de 0,6 °C a cada aumento de 100 m de altitude (AYOADE, 2003).

O *Coffea arabica*, dessas regiões, floresce em temperaturas médias anuais entre 18 °C e 23 °C (DAVIS et al., 2012; SEDIYAMA et al., 2001). A exposição prolongada a 23 °C pode ocasionar em floração acelerada, além de acelerar o desenvolvimento, a maturação dos frutos e perda da qualidade (POHLAN; JANSSENS, 2012). Temperatura inferior a 18 °C provoca atrasos no desenvolvimento dos frutos (CAMARGO, 1985). Em relação à precipitação pluviométrica, considera-se que a precipitação anual presente entre 1.400 e 2.400 milímetros (mm), no entanto um intervalo de 800 e 4.200 mm é aceitável (POHLAN; JANSSENS, 2012).

Tabela 1 - Dados sobre a altitude, precipitação pluviométrica (por ano) e temperatura das regiões produtoras de Minas Gerais.

	<b>Altitude (m)</b>	<b>Precipitação pluviométrica (mm)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>Sul de Minas</b>	750 a 1.350	1200 a 1500	22 e 24
<b>Cerrado</b>	820 a 1.100	1000 a 1200	18 e 21
<b>Zona da Mata</b>	400 a 1.100	1077 a 1647	18 e 22
<b>Norte de Minas</b>	800 a 1.500	<1000	21 e 22

Fonte: Instituto Mineiro de Agropecuária (2000).

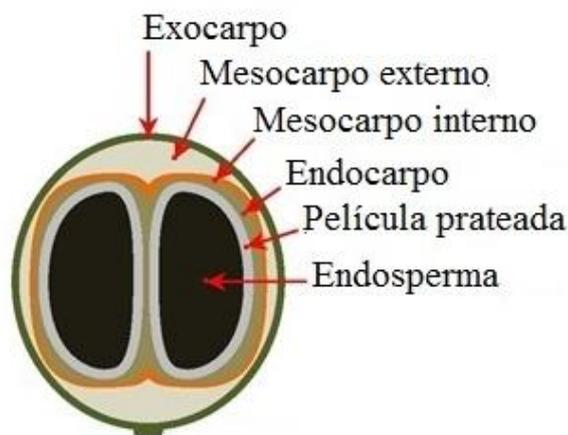
### 2.3 Composição química e qualidade do café

O conhecimento da composição química e da anatomia é importante para a compreensão dos processos fisiológicos, que ocorrem durante a maturação dos grãos do café (BORÉM, 2008). O fruto (FIGURA 2) fresco apresenta 45% de polpa, 10% de mucilagem, 5% de casca e 40% do pergaminho (DIDANNA, 2014). O exocarpo forma a camada externa (liso, espesso, resistente e amargo), comumente encontrado na coloração verde em frutos verdes, e quando

está maduro (amarelo ou laranja a depender do genótipo) em vermelho-violeta ou vermelho escuro.

Em seguida, encontra-se o mesocarpo externo (polpa), caracterizado pela doçura, o mesocarpo interno (mucilagem) composta de pectina, sem cor e viscosa, essa mucilagem está aderida firmemente à uma camada mais interna, denominada endocarpo (pergaminho). O pergaminho é uma fina camada que está em volta nas sementes, protegendo-as. Entre o pergaminho e o grão do café está uma camada fina, excedente do perisperma, denominada pele ou película prateada (BERBERT et al., 2001; BLINOVÁ et al., 2017; BRESSANI et al., 1972).

Figura 2 - Esquema do fruto do café.



Fonte: Adaptado de Zarrinbakhsh et al. (2016).

O exocarpo é constituído majoritariamente de carboidrato, material lignocelulósico (JANISSEN; HUYNH, 2018) e nutrientes (PANDEY et. al., 2000). Os compostos químicos da casca e da polpa são similares, no entanto, pode haver diferença na composição percentual dos constituintes, dependendo das condições ambientais e dos processos pré e pós-colheita do café (ELIAS, 1979). A casca, em base seca, apresenta carboidratos (57,8%), celulose (43%), hemicelulose (7%), umidade (12%), lipídeo (1,5-2,0%), fibra total (31,9%), cinza (6%), proteínas (9,2%), azoto (1,8%), cafeína (1,3%), taninos (4,5-9,3%), ácido clorogênico (12,59%) (JANISSEN; HUYNH, 2018; PANDEY; SOCCOL, 1998).

A polpa é composta, em peso, seca do fruto, de carboidrato (44-50%), celulose (63%), hemicelulose (2,3%), umidade (81,4%), lipídeo (2,5%), fibra total (18-21%), cinza (8,9%), proteínas (10-12%), azoto (3,2%), cafeína (1,25-1,3%), taninos (1,8-8,6%), ácido clorogênico (10,7%) (ELIAS, 1979; JANISSEN; HUYNH, 2018).

Na mucilagem, além da presença da pectina, (30% com base na matéria seca) encontram-se também, celulose (9%) e polissacarídeos não celulósicos (15%) (AVALLONE et al., 2001; BRESSANI et al., 1972). A mucilagem, em base úmida, também é constituída por ácido pécico, água, pequenas quantidades de arabinose, galactose, xilose, ramnose e ácidos orgânicos (ELIAS, 1978).

A película prateada é constituída em base seca por carboidrato (44%), celulose (17,9%), hemicelulose (13,1%), umidade (59-10,3%), lipídeo (2,2%), fibra total (62,4%), cinza (4,7-7%), proteínas (16,2-18,6%), azoto (3%), cafeína (1,4%), taninos (0,02%), ácido clorogênico (15,82%) (JANISSEN; HUYNH, 2018). O pergaminho é constituído de celulose, hemicelulose, lignina e cinza (BEKALO; REINHARDT, 2010; MUSSATTO et al., 2011).

O processamento pós-colheita resulta em grãos verdes, que posteriormente são transformados em grãos torrados e moídos, gerando aroma e sabor característicos para a bebida final (SAKIYAMA; FERRÃO, 2014). De forma geral, a composição química do grão é caracterizada por apresentar diversos constituintes voláteis e não voláteis, como ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, cafeína e outros, bem como enzimas que atuam sobre os próprios constituintes (SIVETZ, 1963).

De acordo com Belitz et al. (2009), os principais constituintes químicos do grão verde são carboidratos, compostos nitrogenados (proteínas, trigonelina e cafeína), lipídeos, ácidos orgânicos, ácido clorogênico, compostos voláteis e água. Dentre os precursores de sabores importantes no grão verde encontra-se ácido clorogênico, cafeína, trigonelina e diterpenos (BAGCHI et al., 2016). Os compostos precursores de aroma importantes são os carboidratos insolúveis, carboidrato solúvel, lipídeos, ácidos clorogênicos e compostos nitrogenados (FADAI et al., 2017).

Após o processo de torrefação, compostos químicos voláteis e não voláteis estão presentes no grão torrado como os álcoois, aldeídos, aminas, ácidos carboxílicos, dicarbonilos, enóis, ésteres, furanos, furanonas, hidrocarbonetos, imidazóis, indóis, cetonas, lactonas, oxazóis, fenóis, pirazinas, piridinas, pirróis, quinoxalinas, compostos de enxofre, terpenos, tiazóis, ácido quínico e ácido clorogênico (BUFFO; CARDELLI-FREIRE, 2004).

A qualidade do café pode ser influenciada por vários fatores, podendo alterar os precursores do aroma e sabor da bebida. Esses fatores estão diretamente relacionado com a composição química dos grãos torrados (AVELINO et al., 2005; CHALFOUN; FERNANDES, 2013; OLIVEIRA et al., 2005). Dentre os fatores que influenciam a qualidade, podem-se destacar a genética, aspectos ambientais, nutricionais e manejo da lavoura, a presença de

microrganismos, os efeitos da adubação, dentre outros (CHALFOUN; FERNANDES, 2013; MESQUITA et al., 2016).

Sabe-se que a diminuição da temperatura provoca uma maturação mais lenta, contribuindo com maior concentração de precursores de aroma e sabor como açúcares, ácidos e aminoácidos (VAAST et al., 2006). Assim, altitudes superiores e período de colheita tardia têm resultado em produtos de melhor qualidade em grande parte das regiões produtoras (GUYOT et al., 1996; SERRANO; CASTRILLÓN, 2002; SILVA et al., 2016; BORÉM et al., 2019).

Na colheita, deve-se separar os frutos de acordo com os diferentes estágios de maturação (BORÉM, 2008; SCHWAN; WHEALS, 2003). Além disso, é importante observar, na pós-colheita, o tipo de processamento do grão verde, o processo fermentativo, secagem, armazenamento, torrefação e moagem, por influenciarem diretamente na qualidade da bebida final. (ESQUÍVEL; JIMÉNEZ, 2012; IAMANAKA et al., 2014; SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014).

A composição do fruto, ao longo da maturação, torna-se um ambiente favorável para o desenvolvimento de microrganismos como as bactérias, leveduras e fungos filamentos. Durante o processo fermentativo, diversas reações bioquímicas ocorrem no fruto por meio da produção de exoenzimas pelos microrganismos, que irão degradar os açúcares e ácidos presentes na mucilagem e produzir metabólitos responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010).

O processo fermentativo em condições não controladas, pode liberar compostos tais como os ácidos butírico e propiônico, que afetam negativamente a qualidade do café (AMORIM; AMORIM, 1977). O controle no processo fermentativo é fundamental, pois pode evitar sabores indesejáveis (FLAMENT, 2001; LEE et al., 2015). Segundo Sampaio (1993), as condições ambientais, regionais ou locais vão propiciar o desenvolvimento de determinados microrganismos, possibilitando fermentações benéficas ou não, interferindo na qualidade da bebida.

A avaliação da qualidade do grão é realizada por procedimentos de classificação, de acordo com as características físicas (contabilizando os números de defeitos, tais como grãos pretos, verdes, ardidos, quebrados, pedras, dentre outros) e sensoriais (que avaliam fragrância, aroma, sabor, finalização, acidez, corpo e outros atributos) (CARVALHO et al., 1994).

Durante a torra do café, em temperaturas superiores a 200 °C, ocorrem reações de Maillard em conjunto com outras reações catalisadas termicamente, sendo responsáveis pela formação de diferentes aromas na bebida do café. Entre os diversos compostos solúveis e

voláteis estão as pirazinas, pirróis, tióis, furanonas, piridinas e tiofenos que são gerados pela conversão de açúcares e aminoácidos (LEE et al., 2015). A composição de cafés torrados, geralmente, é constituída de carboidratos (38-42%), melanoidinas (23%), lipídeos (11-17%), proteínas (10%), minerais (4,5-4,7%), ácidos clorogênicos (2,7-3,1%), ácidos alifáticos (2,4-2,5%), cafeínas (1,3-2,4%), dentre outros (ESQUIVEL; JIMENEZ, 2012).

## 2.4 Fermentação

A palavra fermentação é derivada do latim *fervere*, que corresponde à palavra ferver, em função à liberação de dióxido de carbono pela ação de microrganismos (VICENZI, 2011). Do ponto de vista bioquímico, a fermentação é designada por degradação de forma anaeróbia da glicose ou demais nutrientes orgânicos para obtenção de energia e conservação de ATP (NELSON; COX, 2014).

A fermentação do café é um processo espontâneo realizado pelos microrganismos que estão presentes naturalmente no fruto. Durante o seu processamento, os compostos presentes na polpa e na mucilagem são metabolizados pela microbiota, sobretudo por bactérias e leveduras, para obtenção de energia (EVANGELISTA et al., 2015).

A entrada desses microrganismos até a polpa pode ocorrer pela ação de enzimas pectinolíticas e celulolíticas, proporcionando a abertura de pequenos poros na casca. Com a degradação da mucilagem e da polpa, ocorre a liberação de álcoois, ácidos e outros compostos metabólicos (ácido acético, láctico, dentre outros ácidos carboxílicos), ocorrendo reações metabólicas que vão influenciar a qualidade da bebida do café (EVANGELISTA et al., 2014b; SCHWAN; WHELPS, 2003; SILVA et al., 2013).

A mucilagem é degradada por meio de enzimas liberadas pelos microrganismos (SILVA et al., 2013), tais como: as poligalacturonases que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 em ácido pécico (ácido poligalacturônico); pectinas liases que catalisam a quebra de pectina por transeliminção, liberando ácidos galacturônicos insaturados e a pectina metilesterase, encarregada da desesterificação do grupo metoxil da pectina, ocorrendo a liberação do ácido pécico e metanol (ESKIN; SHAHIDI, 2015).

O tempo da fermentação espontânea pode variar de acordo com a temperatura ambiente. Temperaturas altas e camada espessa de mucilagem podem favorecer o aumento da velocidade de fermentação. Parâmetros como temperatura e oxigênio são importantes ao se estudar o processo fermentativo de café. Esses fatores, assim como espécies presentes, propriedades físicas e químicas do fruto (presente na polpa e na mucilagem) e a ação endógena do próprio

café, influenciam as atividades microbianas durante o processo fermentativo (SCHWAN; WHEALS, 2003).

Conforme Zhang et al. (2019a), a duração da fermentação e o tipo de processamento tem influência na atividade microbiana e, conseqüentemente, na qualidade do grão verde e na qualidade da bebida final.

Estudos envolvendo a fermentação do café na melhoria da qualidade têm-se desenvolvido (BRESSANI et al., 2018; BRESSANI et al., 2020; EVANGELISTA et al., 2014a, 2014b, 2015). No entanto, estudos enfatizando métodos fermentativos como a condução da fermentação em batelada, em ambiente fechado, com limitação de oxigênio e anaerobiose induzida pela microbiota epifítica, são necessários para o controle do processo e, conseqüentemente, para a modulação de sabores na bebida final.

## **2.5 Biorreator**

De modo geral, nos processos fermentativos estão envolvidos os biorreatores, aplicados em escala laboratorial fornecendo uma base para escala industrial (SHI et al., 2019; SU et al., 2018; ZHANG et al., 2019b). O estudo em escala laboratorial é relevante para pesquisas microbiológicas, biotecnológicas e bioquímicas, visando o crescimento de biomassa, produção de metabólitos, dentre outros (TIKHOMIROVA et al., 2018).

Assim, os biorreatores têm como principal objetivo, proporcionar um ambiente controlado para o desenvolvimento dos microrganismos e, conseqüentemente, obter o produto de interesse (WARD, 1989). Para processos fermentativos, existem diversas formas de conduzir o processo, que irá depender das características dos microrganismos, meio de cultivo e da finalidade do processo a ser realizado, sendo assim, proporcionando êxito no rendimento do bioprocessamento (SCHMIDELL et al., 2001).

Em relação à alimentos, a fermentação usando biorreatores pode aumentar a qualidade e modular sabores em cacau, conforme é relatado por Guehi et al. (2010). Na pesquisa de Bressani et al. (2020), notaram-se semelhanças nas características sensoriais em alguns de seus tratamentos com inoculação de leveduras em café, comparado a fermentação sem inoculação conduzida em biorreatores de aço inox. A cafeicultura é um ramo competitivo, assim, novas tecnologias são necessárias para a melhoria na qualidade, visando baixo custo (CNCAFE, 2020; PETEK et al., 2009).

Estudos são necessários para investigar a diversidade microbiológica, perfil químico e sensorial proporcionado por cafés fermentados em sistemas fechados, com indução de anaerobiose sem utilização de água.

## 2.6 Microbiota presente na fermentação espontânea do café

A microbiota presente naturalmente no café é variada, encontra-se bactérias, leveduras e fungos filamentosos (AVALLONE et al., 2001; DE CARVALHO NETO et al., 2018; FENG et al., 2016; MASOUD et al., 2004; SILVA et al., 2000, SILVA et al., 2008). Microrganismos dominantes no processo fermentativo de café são utilizados como culturas iniciadoras (MARTINEZ et al., 2019). Conhecer as diferentes espécies microbianas no café é importante devido à degradação de compostos presentes, e consequentemente, possibilitar a obtenção de bebidas com perfis sensoriais diferenciados (VILELA et al., 2010).

### 2.6.1 Bactérias

As bactérias, independentemente do tipo de processamento, são encontradas em grande quantidade no início da fermentação, seja pela competição por nutrientes ou pelos fatores ambientais envolvidos. No decorrer do processo, esse grupo taxonômico é reduzido (EVANGELISTA et al., 2015; SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010). Bactérias gram-negativas fermentadoras de lactose foram identificadas como predominantes em processamento, pela via úmida de café no Havaí. Foram encontradas bactérias do gênero *Erwinia*, *Paracolobactrum* e *Escherichia*. A espécie *Erwinia dissolvens* se destacou quanto à capacidade de degradar a mucilagem (FRANK et al., 1965).

Bactérias Gram-negativas foram encontradas em abundância em café processado pela via úmida, no México, onde os gêneros *Erwinia* e *Klebsiella* foram os mais frequentes. Ao avaliar açúcares, no decorrer da fermentação, cerca de 60% desses compostos foram degradados pela microbiota total, e não especificamente, pelos microrganismos com atividade pectinolítica (AVALLONE et al., 2001).

Bactérias lácticas, frequentemente isoladas da fermentação do café, são *Leuconostoc mensenteroides*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, em processamento semi-seco e úmido (AVALLONE et al., 2001; EVANGELISTA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018; VILELA et al., 2010). Em processamento natural, o gênero *Lactobacillus* foi o mais comum (SILVA et al., 2000).

No período de dois anos, Silva et al. (2000) avaliaram microrganismos envolvidos durante a maturação e o processamento natural de café arábica, em diferentes fazendas no estado de Minas Gerais. Estes autores observaram que as bactérias eram as mais abundantes, seguidas pelos fungos filamentosos, e por último, as leveduras (SILVA et al., 2000).

Os gêneros de bactérias mais encontrados foram *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Lactobacillus* e *Bacillus*. Silva et al. (2008) relataram a predominância de bactéria nos estágios iniciais da fermentação, e a presença de leveduras e fungos filamentosos no decorrer da fermentação do café natural, possivelmente, devido à diminuição da atividade de água disponível no decorrer da fermentação e secagem.

Vilela et al. (2010) avaliaram a presença de microrganismo em café durante o processamento semi-seco, e identificaram bactérias, leveduras e fungos. As bactérias estiveram em maior população até o período de vinte e quatro horas de fermentação, a população de fungos filamentosos foi reduzida após noventa e seis horas de fermentação. As bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae* foram as predominantes. Nesta pesquisa, os autores utilizaram métodos dependentes e independentes de cultura, eles verificaram que não houve diferença no resultado das espécies de bactérias e leveduras detectadas por plaqueamento e PCR-DGGE.

Feng et al. (2016) estudaram microbiota de café de Yunnan, na China, processado pela via úmida. Relataram que a população de bactérias e leveduras é superior à de fungos filamentosos. Neste estudo, os autores identificaram as seguintes bactérias potenciais para produção de pectinase: *Enterobacter* sp., *Rahnella* sp., *Bacillus cereus* e *Pantoea* sp.

Ribeiro et al. (2018) avaliaram bactérias presentes durante o processo fermentativo do café de diferentes variedades (Ouro Amarelo, Mundo Novo e Catuaí Vermelho), processado pela via úmida. As espécies *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* foram detectadas em todas as variedades. Os autores relataram que as espécies variaram de acordo com a variedade de café e o método de processamento

## 2.6.2 Leveduras

As leveduras são importantes no processo fermentativo devido à grande contribuição de cepas, que produzem enzimas pectinolíticas (AGATE; BHAT, 1966; AVALLONE et al., 2001; SILVA et al., 2008). Produção de pectinases e metabolitos como ácidos e álcoois são características importantes para a avaliação de culturas iniciadoras e para a fermentação de café (EVANGELISTA et al., 2014a, 2014b; SILVA et al., 2013).

Os pesquisadores Agate e Bhat (1966) encontraram leveduras pectinolíticas em fermentação natural de café Robusta, na Índia, onde se destacaram *Saccharomyces marxianus*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Schizosaccharomyces* sp.

No estudo de Silva et al. (2008), cepas de *Debaryomyces hansenii* e *Pichia guilliermondii* foram descritas como potenciais para a atividade pectinolítica. Cepas predominantes no processo úmido, na Tanzânia, foram avaliadas quanto à atividade pectinolítica e a cepa *Hanseniaspora uvarum* foi relatada como atividade poligaracturonase. No mesmo estudo, cepas de *Pichia kluyveri* e *Pichia anomala* foram relatadas como leveduras, com alta capacidade de degradar a mucilagem, além de inibir o crescimento de fungos produtores de ocratoxina A (OTA) durante a fermentação do café (MASOUD; JESPERSEN, 2006).

As leveduras *P. kluyveri* e *H. uvarum* também foram relatadas por Feng et al. (2016) como predominantes e produtoras de pectinase, além da *Pichia fermentans* em fermentação na via úmida, na China. A levedura *Pichia kluyveri* possui a capacidade de crescimento, utilizando a pectina como única fonte de carbono (MASOUD et al., 2004).

Avallone et al. (2001) isolaram leveduras presentes no processo fermentativo de café, por via úmida, no México, e identificaram os gêneros *Kloeckera*, *Candida* e *Cryptococcus*, comumente encontrados em plantas. Os autores ainda verificaram alta capacidade fermentativa com produção de etanol por essas cepas.

Evangelista et al. (2015) avaliaram a microbiota do fruto de café durante a fermentação via úmida, em duas fazendas em Minas Gerais, e observaram as espécies *Meyerozyma caribbica* e *Hanseniaspora uvarum* como leveduras dominantes no café produzido em Lavras, e a espécie *Torulasporea delbrueckii* em Monte Carmelo. A levedura *Torulasporea delbrueckii* também foi encontrada em dominância na pesquisa de Vilela et al. (2010), em processamento semi-seco. Também foram encontradas *Pichia anomala* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

### 2.6.3 Fungos filamentosos

Dentre os grupos de microrganismos encontrados no processo fermentativo do café, os fungos filamentosos encontram-se em um número de indivíduos inferior aos demais, no entanto, no final da fermentação/secagem, ocorre um aumento da população (SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010).

Fungos filamentosos foram isolados e identificados no café, sendo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*, os encontrados em maior abundância (SILVA et al.,

2008). De acordo com os autores, o desenvolvimento destes microrganismos pode ser influenciado por atividades inibitórias de leveduras e bactérias. Na pesquisa de Vilela et al. (2010) em café processado pela via semi-seca, o gênero mais comum foi *Aspergillus*. *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* foram reportados em café despulpado como potenciais pectinolíticos, devido à excreção de enzimas, acelerando a quebra da mucilagem (VAUGHN et al., 1958).

Na literatura, encontram-se relatos sobre os fungos filamentosos como depreciadores da qualidade. No entanto, *Cladosporium* está associado à boa qualidade (ALVES; CASTRO, 1998; CARVALHO et al., 1989). Algumas espécies dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* estão associadas à produção de micotoxinas, como a ocratoxina A, que são provenientes de metabolismo secundário (ISMAYADI; MARSH; CLARKE, 2005; MAJDINASAB et al., 2015; PIMENTA; VILELA, 2003). Micotoxinas estão relacionadas a riscos à saúde, devido às propriedades teratogênicas, hepatóxicas e imunotóxica (PARDO et al., 2005).

## 2.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia baseia-se nas interações entre matéria e radiações eletromagnéticas. Esta interação está relacionada à absorção e emissão de fótons pelos átomos. Na espectroscopia de RMN, uma radiação eletromagnética, na região das radiofrequências (rf), sob um campo magnético, interage com os núcleos dos átomos, produzindo vibrações que são detectáveis e mensuráveis. (CREWS et al., 2009; SILVERSTEIN et al., 2006).

Essa técnica permite explorar as propriedades magnéticas de certos núcleos atômicos para determinar propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas, nos quais eles estão contidos, permitindo caracterizar compostos diversos. Dentre os elementos utilizados, tem-se maior aplicabilidade o núcleo de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), em virtude de sua maior sensibilidade e sua elevada abundância natural (KRISHNAN; KRUGER; RATCLIFFE, 2005). Todo núcleo apresenta um spin nuclear que pode girar em torno do eixo nuclear, ocasionando um dipolo magnético ao longo do eixo.

O núcleo atômico possui propriedade magnética, como o número de spin ( $l$ ) e o momento magnético nuclear ( $\mu$ ). O Núcleo que apresenta spin igual a  $\frac{1}{2}$  remete-se à uma distribuição de carga esférica e uniforme, contribuindo com uma fácil obtenção dos espectros, como é o caso do isótopo  $^1\text{H}$  (CREWS et al., 2009; LEVITT, 2008; SILVERSTEIN et al., 2006). Na Figura 3, encontra-se uma representação dos níveis de energia de hidrogênio sob ação de um campo magnético de magnitude  $B_0$ .

Figura 3 - Representação de níveis de energia para hidrogênio em um campo magnético  $B_0$ .



Fonte: Donald et al. (2016).

O núcleo de hidrogênio possui dois estados de energia que favorecem a aplicação da energia de radiofrequência, de forma a induzir a transição de energia entre esses níveis de energia sob um campo magnético. Sendo assim, ocorrerá absorção de energia pelo hidrogênio, alterando o seu estado de energia para o mais alto, resultando no espectro (SILVERSTEIN et al., 2006). Na ausência de um campo magnético  $B_0$  emitido pela radiofrequência, as energias são as mesmas (LEVITT, 2008).

A frequência da radiação que é absorvida por um determinado núcleo será influenciada pelo ambiente elétrico, ou seja, pelos elétrons circulantes em seu redor ou nos núcleos vizinhos, pela blindagem eletrônica causada por ele (SILVERSTEIN et al., 2006). O deslocamento químico corresponde à frequência relativa de um composto de referência (TSP). Outro efeito envolvendo os núcleos que estão próximos é denominado acoplamento *spin-spin* ( $J$ ), onde “mede-se” a intensidade da interação entre dois núcleos (SILVERSTEIN et al., 2006).

Com isso, tem-se como resultado, um gráfico com deslocamento químico (eixo x) e sua intensidade (eixo y). O deslocamento químico, o local de um sinal no espectro, gera informações sobre o ambiente químico do próton avaliado. Por exemplo, a localização indica como o núcleo está protegido, onde os mais protegidos, devido aos elétrons entornos, possuem sinais localizados mais próximo ao sinal da referência, apresentando frequências mais baixas. Aqueles menos protegidos, núcleos próximos a átomos eletronegativos, têm seu sinal mais afastado do composto de referência, à frequências mais altas. A intensidade relaciona-se com o número de núcleos que origina o sinal (MARTIN; AKOKA; MARTIN, 2008).

Com a técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, é possível identificar e elucidar moléculas, analisar misturas complexas, quimiotaxonomia de espécies e controle de qualidade de alimentos (ALCANTARA et al., 2007; WELJIE et al., 2008).

A RMN tem sido amplamente aplicada à caracterização química de produtos agrícolas em inúmeros alimentos e bebidas (BOEIRA et al., 2020; COLOSIMO et al., 2020; KHATIB et al., 2006; SON et al., 2008), sendo considerada uma ferramenta poderosa, pois não é destrutiva, é rápida, e a preparação de amostra é relativamente simples (ZHU; WANG; CHEN, 2017). Além disso, pode-se obter diferentes informações, como a identificação de constituintes comuns até compostos ativos valiosos, caracterizando-se uma técnica importante para adquirir informações para avaliar a qualidade (MINOJA; NAPOLI, 2014).

A composição química do café tem sido amplamente explorada por meio da utilização de cromatografia líquida e cromatografia gasosa (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2010; CAPRIOLI et al., 2012; DE LUCA et al., 2016; FARAH et al., 2005; LEE et al., 2013; MAEZTU et al., 2001). Apesar de diretas e eficazes em contrapartida, essas técnicas demandam tempo para o pré-tratamento das amostras e requerem padrões para a identificação dos compostos. Além disso, a cromatografia gasosa requer que os compostos sejam voláteis para serem analisados.

Estudos realizados utilizando RMN de  $^1\text{H}$  em amostras de café, permitiram a identificação de compostos que aumentaram a pontuação no teste de xícara (SITTIPOD et al., 2019), informações sobre o conteúdo lipídico (WILLIAMSON; HATZAKIS, 2019); identificação de compostos que possam ser utilizados como marcadores de torrefação e alterações químicas, decorrente da mudança de temperatura na torrefação (FEBVAY et al., 2019).

## **2.8 Análise sensorial - *Temporal Dominance of Sensations* (TDS)**

A análise sensorial consiste em vários métodos e técnicas estabelecidos para medir, com precisão, as respostas humanas aos alimentos e/ou produtos não alimentares, além de fornecer informações importantes para o desenvolvimento de produtos e para os cientistas sobre as peculiaridades dos produtos (LAWLESS; HEYMANN, 2010).

Dentre esses métodos, destaca-se aqui o *Temporal Dominance of Sensations* (TDS), caracterizado por ser descritivo, ou seja, a finalidade é descrever o perfil sensorial do produto (LAWLESS; HEYMANN, 2010).

Esta metodologia foi desenvolvida no *Centre Européen des Sciences du Goût*, no laboratório LIRIS, em 1999, e foi exposta pela primeira vez no *Pangborn Symposium* por Pineau, Cordelle e Schlich (2003). Esta análise sensorial descritivo-temporal foi proposta com o intuito de diminuir a duração do experimento e evitar o efeito halo-dumping (PINEAU et al.,

2009). O TDS permite que vários atributos sejam avaliados simultaneamente, mostra a sequência das sensações dominantes (ou seja, atributo mais marcante) de um produto ao longo de um certo tempo (PINEAU et al., 2009, 2012).

São apresentados aos provadores os atributos, previamente estabelecidos na tela do computador. Os atributos que descrevem o produto analisado são gerados durante o treinamento, e distintos métodos de seleção da lista de atributos são empregados pelos pesquisadores (Di MONACO et al., 2014).

Durante a análise do produto, os provadores são orientados a indicar o atributo dominante durante o tempo de avaliação. Os resultados são expressos em curvas que remetem a taxa de dominância dos atributos (eixo X) versus o tempo (eixo Y). O gráfico apresenta, além das curvas e da taxa de dominância, a “linha de chance” e a “linha de significância”. A linha de chance é o valor de dominância que um atributo pode ter ao acaso, e a linha de significância é o valor mínimo de um atributo considerado significativo (PINEAU et al., 2009).

Apesar do TDS não avaliar a intensidade de um atributo, a taxa de dominância fornece informações temporais importantes (LABBE et al., 2009). Bruzzone et al. (2013) e Braghieri et al. (2016) relataram que o TDS permite maiores coletas de informações quando comparada por análise de intensidade. Os autores apontaram que o atributo mais marcante avaliado pelos provadores não é, necessariamente, o mais intenso.

O TDS tem sido amplamente aplicado em vários produtos na área alimentícia, como em vinhos (MEILLON et al., 2010; SOKOLOWSKY; FISCHER, 2012), iogurtes (BRUZZONE et al., 2013), queijo (RODRIGUES et al., 2018) e café (EVANGELISTA et al., 2015). O café caracteriza-se por ser uma bebida complexa, composta por vários compostos voláteis que contribuem para o sabor (EVANGELISTA et al., 2014a, 2014b).

De acordo com Labbe et al. (2009), em produtos com sensações complexas, o TDS pode contribuir com mais informações ao ser comparado com outros métodos. Assim, a avaliação por meio da metodologia TDS permite avaliar, de forma rápida e eficaz, simultaneamente, vários atributos ao longo do tempo, até o momento que a percepção termine (PINEAU et al., 2009).

## CONCLUSÃO GERAL

A etapa de processamento do café é relevante por envolver a fermentação e proporcionar a qualidade da bebida. O fruto do café torna-se um ambiente favorável para o desenvolvimento de microrganismos que metabolizam a polpa e a mucilagem, podendo produzir compostos voláteis, que interferem na qualidade sensorial da bebida. Existem vários estudos sobre a microbiota do café em fermentação espontânea e a sua influência na qualidade da bebida.

Novas metodologias para a condução da fermentação estão entrando na cafeicultura, proporcionando uma melhoria na qualidade ao produzir cafés especiais. Tais metodologias como o uso de biorreatores, sistema fechado com indução à anaerobiose pela microbiota epifítica do fruto, no processo pós-colheita.

No entanto, há uma escassez de estudos científicos para compreender a diversidade microbiana como a sucessão microbiana, cujos microrganismos dominam neste processo em diferentes fermentações, que contribuem para o perfil químico e sensorial da bebida final. O enriquecimento do conhecimento a respeito dos inúmeros microrganismos dominantes, envolvidos na fermentação de café e em diferentes regiões produtoras, permite melhorar os resultados em processos induzidos por culturas iniciadoras.

## REFERÊNCIAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. **Journal of Applied Microbiology**, England, v. 2, n. 14, p. 256-260, Mar. 1966.
- ALCANTARA, G. B. et al. Chemometric analysis applied in <sup>1</sup>H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 595, n. 1-2, p. 3-8, July 2007.
- ALVES, E.; CASTRO, H. A. Fungos associados ao café (*Coffea arabica L.*) nas fases pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 24, n. 1, p. 4-7, jan./mar. 1998.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Tocopherols in coffee brews: Influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. **Journal of Food Composition and Analysis**, United States, v. 23, n. 8, p. 802-808, Dec. 2010.
- ALVES, H. M. R.; VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C.; BORÉM, F. M. BARBOSA, J. N. Características ambientais e qualidade da bebida dos cafés do estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, n. 261, p., mar. /abr. 2011.
- AMORIM, H.V.; AMORIM, V.L. Coffee enzyme and coffee quality. In: ORY, R.L. & ANGELO, A.J. Enzymes in food and beverage processing. Washington: **American Chemical Society**, p. 27-56, 1977.
- AVALLONE, S.; GUYOT, B.; BRILLOUET, J. M.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. **Current Microbiology**, v. 42, p. 252-256, 2001.
- AVELINO, J.; BARBOZA, B.; ARAYA, J. C.; FONSECA, C.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B.; CILAS, C.. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 11, v. 85, p. 1869-1876, 2005.
- AYOADE, J. O. **Introdução à climatologia para os trópicos**. 9 ed Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2003.
- BAGCHI, D.; MORIYAMA, H.; SWAROOP, A. **Green coffee bean extract in human health**. CRC PRESS: BOCA RATON. 2016.
- BARBOSA, J. N.; BORÉM F. M.; ALVES, H. M. R. VOLPATO, M. M. L.; VIEIRA, T. G. C.; SOUZAV. C. O. Spatial distribution of coffees from Minas Gerais State and their relation with quality. **Coffee Science**, n. 5, p. 237-250, 2010.
- BEKALO, S. A.; REINHARDT; H.-W. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. **Materials and Structures**, v. 43, p. 1049-1060, 2010.
- BELITZ, H. D; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**, 4<sup>a</sup> ed.; Springer-Verlag: Berlim, Alemanha, 2009.

BERBERT, P. A.; QUEIROZ, D. M.; SOUSA, E. F.; MOLINA, M. B.; MELO, E. C.; FARONI, L. R. D. PH – Postharvest Technology: Dielectric properties of parchment coffee. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 80, n. 1, p. 65–80, Set. 2001.

BLINOVÁ, L.; SIROTIK, M.; BARTOŠOVÁ, A; SOLDÁN, M. Review: Utilization of Waste From Coffee Production. **Research papers**, v. 25, n. 40, p. 91-101, 2017.

BOEIRA, L. S.; BASTOS FREITAS, P. H.; UCHÔA, N. R; BEZERRA, J. A.; CÁD, S. V.; JUNIOR, S. D.; ALBUQUERQUE, P. M.; MAR, J. M ; RAMOS, A. S.; MACHADO, M. B.; MACIEL, L. R.. Chemical and sensorial characterization of a novel alcoholic beverage produced with native acai (*Euterpe precatoria*) from different regions of the Amazonas state. **LWT**, v. 117, 2020.

BORÉM, F. M. **Pós colheita do café**. Lavras: UFLA, p. 630, 2008.

BORÉM, F. M.; CIRILLO, M.Â. ; DE CARVALHO ALVES, A.P. ; DOS SANTOS, C.M. ; LISKA, G.R. ; RAMOS, M.F. ; DE LIMA, R.R. Coffee sensory quality study based on spatial distribution in the Mantiqueira mountain region of Brazil. **Journal of Sensory Studies**, 2019.

BRANDO, C. H. J.; BRANDO, M. F. P. Methods of coffee fermentation and drying. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Ed.). *Cocoa and Coffee Fermentations*. Florida, EUA: CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 341-365, 2015.

BRASIL. **Ministério da Agricultura. Café no Brasil**. (2016). Acesso em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>> 08/07/2018.

BRAGHIERI, A.; PIAZZOLLA, N.; GALGANO, F.; CONDELLI, N.; ROSA, G. De; Napolitano, F. Effect of preservative addition on sensory and dynamic profile of Lucanian dry-sausages as assessed by quantitative descriptive analysis and temporal dominance of sensations. **Meat Science**, v. 122 p. 68-75, 2016.

BRESSANI, R.; ESTRADA, E.; JARQUIN, R. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba**, p. 299-304. 1972.

BRESSANI, A. P. P.; MARTINEZ, S. J.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 212-219, 2018.

BRESSANI, A. P. P.; MARTINEZ, S. J. ; SARMENTO, A. B. I.; BORÉM, F. M. ; SCHWAN, R. F. Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. **Food Research International**, v. 128, 2020.

BRUZZONE, F.; ARES, G.; GIMÉNEZ, A. Temporal aspects of yoghurt texture perception. **International Dairy Journal**, n.2, v. 29, p. 124-134, 2013.

BSCA - Brazil Specialty Coffee Association. **Regiões produtoras de café no Brasil**. 2019. Acesso em <<http://brazilcoffeation.com.br/mapa-regioes>> 08/12/2019.

BUFFO, R. A.; CARDELLI-FREIRE, C. **AROMA DE CAFÉ: UMA VISÃO GERAL SABOR E FRAGRÂNCIA JOURNAL**, ed. 19, p. 99-104, 2004.

CAMARGO, A. P. de O. Clima e a cafeicultura no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, 1985.

CAMARGO, M. B. P. de; PEDRO JÚNIOR, M. J.; CAMARGO, A. P.; FAHL, J. I.; FAZUOLI, L. C.; SANTOS, M. A. Modelos agrometeorológicos de estimativa da duração do estágio floração-maturação para três cultivares de café arábica. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p1011-1018, 2010.

CAPRIOLI, G.; CORTESE, M.; CRISTALLI, G.; MAGGI, F.; ODELLO, L.; RICCIUTELLI, M.; SAGRATINI, G.; SIROCCHI, V.; TOMASSONI, G.; VITTORI, S. Optimization of espresso machine parameters through the analysis of coffee odorants by HS-SPME-GC/MS. **Food Chemistry**, n. 3, v. 135, 2012.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. DE R.; CHALFOUN, S. M.; BOTREL, N.; JÚNIOR, E. S. G. J. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.29, n.3, p.449-454, mar. 1994.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química e química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, p. 25-26, 1989.

CASAS, M. I.; VAUGHAN, M. J.; BONELLO, P.; GARDENER, B. M.; GROTEWOLD, E.; ALONSO, A. P. Identification of biochemical features of defective *Coffea arabica* L. beans. **Food Research International**. v. 95, p. 59-67, May, 2017.

CHALFOUN, S. M.; REIS, P. R. História da cafeicultura no Brasil. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L.. *Café arábica: do plantio à colheita*. Lavras: Epamig, v. 1, p. 21-86, 2010.

CHALFOUN, S. M.; FERNANDES, A. P. Efeitos da fermentação na qualidade da bebida do café. **Visão agrícola**, n 12, p. 105- 108, 2013.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. **Botanical classification of coffee**. In: CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C. (Eds.) *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. London: Croom Herm, Westport, Conn, p. 13-47. 1985.

CNCAFE. **Conselho Nacional do café**. Disponível em:<<https://www.cncafe.com.br/site/index.php>> Acesso em: fev. 2020.

COLOSIMO, R.; GABRIELE, M.; CIFELLI, M.; LONGO, V.; DOMENICI, V.; PUCCI, L. The effect of sourdough fermentation on *Triticum dicoccum* from Garfagnana: 1H NMR characterization and analysis of the antioxidant activity. **Food Chemistry**, 2020.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de café – Quarto levantamento Dezembro/2019. 2019.

CREWS, P.; RODRIGUEZ, J.; JASPARS, M. **Organic structure analysis**. 2. ed. Nova York: Oxford University Press, p. 656, 2009.

DAVIS A. P.; GOVAERTS, R; BRIDSON, D.M; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of genus *Coffea* (Rubiaceae). **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 152, n. 4, p. 465-512. 2006.

DAVIS, A. P.; GOLE, T. W.; BAENA, S.; MOAT. J. The Impact of Climate Change on Indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*): Predicting Future Trends and Identifying Priorities, **PLoS ONE**, vol.7, n. 11, p.47981, 2012.

DE ASSIS SILVA, S.; QUEIROZ, D. M.; FERREIRA, W. PINTO M.; CORRÊA, P. C.; RUFINO, J. L. S. Mapping the potential beverage quality of coffee produced in the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 3098-3108, 2016.

DE CARVALHO NETO, D. P.; DE MELO, G. V.; DE CARVALHO, J. C.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. High-throughput rRNA gene sequencing reveals high and complex bacterial diversity associated with brazilian coffee bean fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, n. 1, v. 56. p. 90-96, 2018

DE LUCA, S.; DE LUCA, S.; DE FILIPPIS, M; BUCCI, R.; MAGRÌ, A. D.; MAGRÌ, A. L. ; MARINI, F. Characterization of the effects of different roasting conditions on coffee samples of different geographical origins by HPLC-DAD, NIR and chemometrics. **Microchemical Journal**, v.129, p.348-361, 2016.

Di MONACO, R.; SU, C.; MAIS, P.; CAVELLA, S. Temporal Dominance of Sensations: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, p. 104-112, 2014.

DIDANNA, H. L. "A critical review on feed value of coffee waste for livestock feeding," **World J. Biol. Biol. Sci.**, v. 5, n. 2, p. 72-86, August. 2014.

ELIAS. L. G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM. J. E.: BRESSANI. R. (Ed.). **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP. p. 19-29, 1978.

ELIAS, L. G. IN: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **COFFEE PULP: Composition, technology and utilization**, PUBLICATION 108E, INTERNATIONAL DEVELOPMENT RESEARCH CENTRE, OTTAWA, ONT. p. 1724, 1979.

ESKIN, M.; SHAHIDI, F. **Bioquímica de alimentos**. Elsevier Brasil, 3 ed, 2015.

ESQUÍVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, n. 2, v. 46, p. 488-495, 2012.

EVANGELISTA, S. R.; DA CRUZ PEDROZO MIGUEL, M. G.; DE SOUZA CORDEIRO, C.; SILVA, C. F.; MARQUES PINHEIRO, A. C.; SCHWAN, R. F. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, v.44, p. 87-95, 2014a.

EVANGELISTA, S. R.; SILVA, C. F.; MIGUEL, M. G. P. DA C.; CORDEIRO, C. DE S. ; PINHEIRO, A. C. M. ; DUARTE, W. F. ; SCHWAN, R. F. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v. 61, p. 183-195, 2014b.

EVANGELISTA, S. R.; MIGUEL, DA CRUZ PEDROSO, M. G.; SILVA, C. F. ; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 102-112, 2015.

FADAI, N. T.; MELROSE, J.; PLEASE, C. P., SCHULMAN, A.; VAN GORDER, R. A. A heat and mass transfer study of coffee bean roasting. **Int. J. Heat Mass Tran.** n. 104, p. 787-799, 2017.

FARAH, A.; DE PAULIS, T.; TRUGO, L. C.; MARTIN, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 5, v. 53, p. 1505-15013, 2005.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A. S.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes os Brazillian coffe. *Food Chemical*, Kidlington Oxford, United Kingdom v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FEBVAY, L.; HAMON, E.; RECHT, R.; ANDRES, N.; VINCENT, M.; AOUDÉ-WERNER, D.; THIS, H. Identification of markers of thermal processing (“roasting”) in aqueous extracts of *Coffea arabica* L. seeds through NMR fingerprinting and chemometrics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, , v. 57, n. 9, p. 589-602, 2019.

FENG, X. DONG, H. ,YANG, P.; YANG, R.; LU, J.; LV, J.; SHENG, J. Culture-Dependent and -Independent Methods to Investigate the Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. **Current Microbiology**, n. 2, v. 73, p. 190-195, 2016.

FLAMENT, I. **Coffee Flavor Chemistry**; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2001.

FRANK, H. A; LUM, N.A.; CRUZ, A.S.D. Bacteria responsible for mucilage-layer decomposition in kona coffee cherries. **Appl. Microbiol.**, n. 13, p. 201-207, 1965.

GUEHI, T. S.; DADIE, A. T.; KOFFI, K. P. B.; DABONNE, S.; BAN-KOFFI, LOUIS; KEDJEBO, KRA D.; NEMLIN, G. J.. Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 2508-2514, 2010.

GUYOT, B.; GUEULE, D.; MANEZ, J.C.; PERRIOT, J. J.; GIRON, J.; VILLAIN L. Influence de l’altitude et de l’ombrage sur la qualité des cafés Arabica. **Plantations, recherche, développement**, n. 4, v. 3, p. 272-283,1996.

IAMANAKA, B. T.; TEXEIRA, A. A.; TEXEIRA, A. A. R.; COPETTI, M. V.; BRAGAGNOLO, N; TANIWAKI, M. H. The mycobiota of *coffee* beans and its 908 influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 62, p. 353-358, 2014.

ICO, **Organização Internacional do Café**. 2019. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: out. 2019.

ISMAYADI, C.; MARSH, A.; CLARKE, R. Influence of Storage of Wet Arabica Parchment Prior to Wet Hulling on Moulds Development, OchratoxinA Contamination, and Cup Quality of Mandheling *Coffee*. **Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)**, n. 2, v. 1, 2005.

JANISSEN, B.; HUYNH T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review Resources, **Conservation and Recycling**, v. 128, p. 110-117, 2018.

KHATIB, A.; WILSON, E. G ; KIM, H. K.; LEFEBER, A. W. M ; ERKELENS, C.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer. **Analytica Chimica Acta**, v.158, p.89-99 , 2006.

KNOPP, S.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. **European Food Research and Technology**, 2006.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany. Anais..** n. 410, v. 56, p. 255-65, 2005.

LABBE, D.; SCHLICH, P; PINEAU, N.; GILBERTA, F.; MARTIN, N. Temporal dominance of sensations and sensory profiling: a comparative study. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 20, p. 216-221, 2009.

LAWLESS, H. T., HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. 2 ed. New York: Springer, 2010.

LEE, C.; LEE, Y.; LEE, J. G. ; BUGLASS, A. J. Development of a simultaneous multiple solid-phase microextraction-single shot-gas chromatography/mass spectrometry method and application to aroma profile analysis of commercial coffee. **Journal of Chromatography A**, v.1295, p. 24-41 2013.

LEE, L. W.; CHEONG, M. W.; CURRAN, P.; YU, B.; LIU, S. Q. Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**, v. 185, p. 182-192, 2015.

LEVITT, M. H. **Spin Dynamics: Basic of nuclear magnetic resonance**; 2nd edition; Wiley, 2008.

MAEZTU, L.; SANZ, C.; ANDUEZA, S.; DE PEÑA, M. P. ; BELLO, J.; CID, C. Characterization of espresso coffee aroma by static headspace GC-MS and sensory flavor profile. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 11, v.49, p.5437-5444, 2001.

MAJDINASAB, M.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; LI, P.; ZHANG, QI ; LI, X.; TANG, X. Ultrasensitive and quantitative gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection of ochratoxin A in agro-products. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 974, p.147-154, 2015.

MANZO, J. Machines, people, and social interaction in “Third-Wave” coffeehouses. **Journal of Arts and Humanities**, v. 3, n. 8, p. 1-12, 2014

MARTIN, G. J.; AKOKA, S.; MARTIN, M. L. SNIF-NMR—Part 1: Principles. *Modern Magnetic Resonance*, p. 1651-1658, 2008.

MARTINEZ, S. J.; BRESSANI, A. P. P. ; DIAS, D. R ; PAVESI, J.; SCHWAN, R. F. Effect of Bacterial and Yeast Starters on the Formation of Volatile and Organic Acid Compounds in Coffee Beans and Selection of Flavors Markers Precursors During Wet Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 10:1287-13, 2019.

MARTINS, A. L. **História do café**. 2 ed. São Paulo: contexto. 2012.

MARTINS, P. M. M.; BATISTA, N. N.; MIGUEL, M. G. DA C. P.; PAVESI, J. B.; SOARES, S. J. R.; SCHWAN, R. F. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. **Food Research International**, v. 129, 2020.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, v. 21, n. 7, p. 549-556, May 2004.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 291-296, 2006.

MESQUITA, C. M. de; REZENDE, J. E.; CARVALHO, J. S.; JÚNIOR, M. A. F.; MORAES, N. C.; DIAS, P. T.; CARVALHO, R. M.; ARAÚJO, W. G.. **Manual do café: colheita e preparo (Coffea arábica L.)**. Belo Horizonte: EMATER-MG, p. 52, 2016.

MEILLON, S.; VIALA, D MEDEL, M; URBANO, C; GUILLOT, G; SCHLICH, P Impact of partial alcohol reduction in Syrah wine on perceived complexity and temporality of sensations and link with preference. **Food Quality and Preference**, n. 7, v.21, p.732-740, 2010.

MINOJA, A. P.; NAPOLI, C. NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. **Food Research International**, v. 64, p.123-161, 2014.

MORELI, A. P. **Café - Histórico, variedades e mercados**. Universidade do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias. Tecnologia de Pós-Colheita. Disponível em: <<http://www.agais.com/tpc/capitulo.php>> Acesso em: 03 de dezembro de 2019.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45-58, Set. 2012.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Production, composition and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 661-672, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de lehniger**. 6. ed Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, S. D.; FRANCA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A.; BORGES, M. L. A. The effect of roasting on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. **Food Chemistry**, v. 90, p. 287-291, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Bioconversion of biomass: a case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Arch. Biol. Technol.** n. 4, v. 41, p. 379-390, 1998.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, n. 6, p. 153-162, 2000.

PARDO, E.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 133-138, 2005.

PETEK, M. R.; \*; SERA, T.; FONSECA, I. C. de B. Climatic requirements for fruit development and ripening of *Coffea arabica* cultivars. **Bragantia**, v.68, n.1, Campinas 2009.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana e ocratoxina a no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 6, v. 27, 2003.

PINEAU, N.; CORDELLE, S.; SCHLICH, P. Temporal dominance of sensations: a new technique to record several sensory attributes simultaneously over time. In: 5TH PANGBORN SENSORY SCIENCE SYMPOSIUM, 2003, Boston. **Apresentação...** Boston: PANGBORN, 2003.

PINEAU, N.; SCHLICH, P.; CORDELLE, S.; MATHONNIÈRE, C.; ISSANCHOU, S.; IMBERT, A.; ROGEAUX, M.; ETIÉVANT, P.; KOSTER, E. Temporal Dominance of Sensations: Construction of the TDS curves and comparison with time-intensity. **Food Quality and Preference**, v. 20, n. 6, p. 450-455, Sep. 2009.

PINEAU, N.; BOUILLÉ, A. G.; LEPAGE, M.; LEFANT, F.; SCHLICH, P.; MARTIN, N.; RYTZ. Temporal Dominance of Sensations: What is a good attribute list? **Food Quality and Preference**, v. 26, p. 159-165, 2012.

POHLAN, H. A. J.; JANSSENS, M. J. J. **Growth and production of coffee**. Soil, Plant Growth Crop Produc, v. 3, p. 1-11, 2012.

PRIVAT, I.; FOUCRIER, S.; PRINS, A.; EPALLE, T.; EYCHENNE, M.; KANDALAFT, L.; CAILLET, V.; LIN, C.; TANKSLEY, S.; FOYER, C.; MCCARTHY, J. Differential regulation of grain sucrose accumulation and metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta) revealed through gene expression and enzyme activity analysis. **New Phytologist**. v. 178, n. 4, p. 781-797, 2008.

RIBEIRO, L. S.; EVANGELISTA, S.; MIGUEL, M.; MULLEM, J.; SILVA, C.; SCHWAN, R. Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee varieties processed by wet fermentation. **Annals of Microbiology**, n. 10, v. 68, p. 705-716, 2018.

RODRIGUES, J. F.; SOUZA, V. R. DE ; LIMA, R. R.; CRUZ, A. G. DA ; PINHEIRO, ANA CARLA M; Tds of cheese: Implications of analyzing texture and taste simultaneously. **Food Research International**, v.106, p.1-10, 2018.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. Volume 2, São Paulo: Edgar Bülcher, 2001.

SCHWAN R. F; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. IN: T. BOEKHOUT, V. ROBERT (Ed), **Yeasts in food**, Behr's Verlag, Germany, p. 429-449, 2003.

SAMPAIO, J. B. R. **Colheita e preparo do café: aspectos qualitativos**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1993.

SAKIYAMA, N. S.; FERRÃO, M. A. **Botânica e produção de café**, p 341 - 365 . Em Schwan RF , Fleet GH (ed), fermentações de cacau e café , 1ª ed . CRC Press , Boca Raton, FL, 2014 .

SEDIYAMA, G. C.; JUNIOR, J. C. F. DE M.; SANTOS, A. R. DOS; RIBEIRO, A.; COSTA, M. H.; HAMAKAWA, P. J.; COSTA, J. M. N. DA; COSTA, L. C. Zoneamento agroclimático do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) para o estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Passo fundo, v.9, n.3, p.501-509, 2001.

SERRANO, C. E. B.; CASTRILLÓN, J. J. C. Influencia de La Altitud em La Calidad de La Bebida de Muestras de Café Procedente Del Ecotopo 206B En Colombia. **Cenicafé**, n. 3, v. 30, p. 353-356, 2002.

SHI; J. Y. Z.; ZAN, Y.; ZHOU, M.; HE, M.; WANG, Q.; LI, X.; WEN, Z.; CHEN, S. High-level production of short branched-chain fatty acids from waste materials by genetically modified *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**. v. 271, p. 325-331, Jan. 2019.

SILVA, C. F.; SILVA, C. F ; SCHWAN, R. F.; SOUSA DIAS, E.; WHEALS, A. E I. **Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of Coffea arabica in Brazil**. International Journal of Food Microbiology. **Anais**, n.2, v 60, p 251-260, 2000.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, n. 8, v. 25, p. 951-957, 2008.

SILVA, C. F.; VILELA, D. M.; CORDEIRO, C. de S.; DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 2, v. 29, p. 235-247, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 506, 2006.

SITTIPOD, S.; SCHWARTZ, E.; PARAVISINI, L. PETERSON, D. G F Identification of flavor modulating compounds that positively impact coffee quality. **Food Chemistry**, v. 301, p. 125250, 2019.

SIVETZ, M. **Coffee Processing Technology**. v. 2. London, England: The Avi publishing Company, INC. 1963.

SOKOLOWSKY, M.; FISCHER, U. Evaluation of bitterness in white wine applying descriptive analysis, time-intensity analysis, and temporal dominance of sensations analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 46-47, 2012.

SON, H. S.; KIM, K. M.; VAN DEN BERG, F.; HWANG, G. S.; PARK, W. M.; LEE, C. H.; HONG, Y. S. 1H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 17, v. 56, p. 8007-8016, 2008.

SU, L.; WANG, T.; YU, L; WU, J. Highly efficient extracellular expression of naturally cytoplasmic *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 93, p. 3135-3142, Nov. 2018.

SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, v. 62, p. 315-325, 2014.

TIKHOMIROVA, T. S.; TARASKEVICH, M. S.; PONOMARENKO O. V. The role of laboratory-scale bioreactors at the semi-continuous and continuous microbiological and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 7293-7308. 2018.

VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J. J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M.. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 2, v. 56, p. 197-204, 2006.

VAUGHN, R. H.; CAMARGO, R. De; FALLANGE, H.; MELLO AYRES, G.; SERGEDELLO, A. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. **Food Technology**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 12-57, 1958.

VICENZI, R. **Biotecnologia de alimentos**. Ijuí. p. 89, 2011.

VILELA, D. M.; PEREIRA, G. V. DE M; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. S. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, n. 8, v. 27, p. 1128-1135, 2010.

WARD, O. P. **Biotecnologia de la fermentacion: principios, procesos y productos**. Zaragoza: Acribia, p. 274. 1989.

WELJIE, A. M. WELJIE, A. M.; NEWTON, J.; JIRIK, F. R.; VOGEL, H. J. Evaluating low-intensity unknown signals in quantitative proton NMR mixture analysis. **Analytical Chemistry**, n. 8023, v. 80, p. 8956-9010, 2008.

WILLIAMSON, K.; HATZAKIS, E. Evaluating the effect of roasting on coffee lipids using a hybrid targeted-untargeted NMR approach in combination with MRI. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125039, 2019.

ZARRINBAKHS, N.; WANG, T.; RODRIGUEZ-URIBE, A.; MISRA, M.; Mohanty, A. K. "Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production". **BioRes.** v. 11, n. 3, p. 7637-7653, July. 2016.

ZHANG, S. J.; BRUYN, F. De; POTHAKOS, V.; TORRES, J. FALCONI, C.; MOCCAND, C.; WECKX, S.; VUYSTA, L. De. Following Coffee Production from Cherries to Cup: Microbiological and Metabolomic Analysis of Wet Processing of *Coffea arabica*, v. 85, n.6, **Applied and Environmental Microbiology**, 2019a.

ZHANG, XIAO-FENG; AI, YUN-HAN; XU, YAN; YU, XIAO-WEI. High-level expression of *Aspergillus niger* lipase in *Pichia pastoris*: Characterization and gastric digestion in vitro. **Food Chemistry**. v. 274, p. 305-313, feb. 2019b.

ZHU, W.; WANG, X.; CHEN, L. Rapid detection of peanut oil adulteration using low-field nuclear magnetic resonance and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 216, p. 268-274, 2017.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO****ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, PERFIL QUÍMICO E  
SENSORIAL DE CAFÉS FERMENTADOS EM BIORREATORES**

## RESUMO

A comunidade microbiana associada ao processo fermentativo natural ou via úmida do café tem sido amplamente estudada. No entanto, poucos relatos existem sobre microbiota em diferentes ambientes em cafés fermentados em biorreatores com sistema de batelada fechado, e com indução de anaerobiose pela própria microbiota epifítico e nem sobre a influência deste sistema na composição química e qualidade sensorial da bebida final. O objetivo da pesquisa foi investigar a diversidade microbiana em diferentes fermentações utilizando a mesma metodologia, avaliar o perfil químico e sensorial de cafés fermentados em biorreatores em diferentes regiões produtoras do estado de Minas Gerais, Brasil. Duas cidades no Sul de Minas (Carmo de Minas e Três Pontas), uma em Matas de Minas (Lajinha) e outra no Cerrado (Monte Carmelo). Para a análise da microbiota realizou contagens da população de bactérias mesofílicas, bactérias ácido-lático (BAL) e leveduras por meio de plaqueamento em superfície. Os isolados foram agrupados e identificados por meio de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) e sequenciamento da região ribossômica. A determinação do perfil químico foi avaliada por meio de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ), e análise sensorial dos grãos torrados pela metodologia Dominância Temporal das Sensações (TDS). Houve diferença significativa nas contagens populacional de grupos microbianos entre os tempos de fermentação e processamento. A região Sul de Minas apresentou contagens superiores durante a fermentação em biorreatores, em Três Pontas as bactérias mesofílicas aumentaram de 5,91 Log UFC/g no início a 9,17 Log UFC/g em 46h, as bactérias lácticas aumentaram 4,54 Log UFC/g no início a 7,17 Log UFC/g em 46 h e em Carmo de Minas a contagem populacional de leveduras aumentou de 4,69 Log UFC/g no tempo inicial a 6,30 Log UFC/g em 21 h. Trezentos e oitenta microrganismos foram isolados, 149 bactérias mesofílicas, 147 bactérias ácido-láticas e 84 leveduras. A abundância de cada microrganismo foi calculada em relação a cada processo de cada cidade. A população de bactérias predominou durante o processo fermentativo em cafés fermentados em biorreatores. Diversidade de microrganismos dominantes foram encontradas em cafés de diferentes regiões em cafés fermentados em biorreatores. Leveduras e bactérias específicas foram identificadas em cafés nas diferentes regiões. As leveduras *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, foram detectadas apenas nas cidades de Carmo de Minas (CM), Três Pontas (TP), Lajinha (LAJ) respectivamente. Em Monte Carmelo (MC) *Saccharomyces cerevisiae* foi detectada em maior abundância. As bactérias *Zymomonas mobilis* e *Leuconostoc lactis* foram detectadas em CM. *Acinetobacter johnsonii* e *Enterobacter cloacae* foram detectadas apenas em TP. *Enterobacter hormaechei* foi detectada apenas em LAJ. *Bacillus cereus* em MC. *Hanseniaspora uvarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella cibaria* foram detectadas em todas as regiões. A maior diversidade de bactérias mesofílicas foi encontrada em cafés naturais em LAJ. No processo CD maior diversidade foi encontrada em MC. Leveduras com maior diversidade foram encontradas em TP no processo natural e em CM no processo CD. A RMN de  $^1\text{H}$  juntamente com a análise de componentes principais (PCA) permitiu separação entre os grãos verdes de cafés fermentados em biorreatores e controle. O ácido lático contribuiu para a separação, foi detectado em altos níveis em biorreatores. Ácido quínico e ácido clorogênico foram correlacionados aos cafés em CM no grão torrado. As curvas de TDS variaram com a região e com o tipo de processamento pós colheita realizado. Dentre as regiões estudadas, no café natural no Cerrado e no café descascado em Matas de Minas, os atributos caramelo e chocolate foram dominantes e específicas, respectivamente. O atributo caramelo e amadeirado foram detectados apenas na região Cerrado, no café natural e café

descascado, respectivamente. A dominância do atributo frutado foi comum na região Mata de Minas no café natural e na região Sul de Minas café descascado. A condução da fermentação em batelada, ambiente fechado, com limitação de oxigênio e anaerobiose induzida pela microbiota epifítica alterou a microbiota que influenciou a composição química e sensorial. Dentre os grupos microbianos estudados, as bactérias foram as dominantes durante todo o processo fermentativo conduzido nos biorreatores. A microbiota apresentou comportamento diferente nas distintas variedades. A diversidade em cada fazenda indicou uma microbiota específica para a região geográfica e influenciou e influenciou nos sabores. Os cafés fermentados em biorreatores apresentaram mais compostos químicos precursores de sabores e aromas foram correlacionados ao café verde e mais atributos sensoriais foram percebidos em relação ao controle.

Palavras-chaves: Sistema fechado. Indução à anaerobiose. Microbiota.

## ABSTRACT

Microbial communities associated with the natural coffee fermentation process or wet coffee have been widely investigated. However, there are few reports about fermented coffees in bioreactors with a closed batch system and with the induction of anaerobiosis by the epiphytic microbiota itself, nor about the influence of this system on the chemical composition and sensory quality of the final beverage. In this study, the microbiological aspects, chemical and sensory profile of fermented coffees in bioreactors in three producing regions of Minas Gerais, Brasil, were evaluated. Two cities in Sul de Minas (Carmo de Minas and Três Pontas), one in Matas de Minas (Lajinha), and another one in Cerrado (Monte Carmelo). Two processes were carried out, natural coffee beans and pulped coffee (PC). The population of bacteria was evaluated by plating on cultivation media for mesophilic bacteria (Nutrient Agar), lactic acid bacteria (Man Agar, Rogosa and Sharpe), and yeasts (agar YEPG). Chemical compounds were analyzed through Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  NMR). Sensory analysis was conducted by TDS (Temporal Dominance of Sensations). There was a significant difference in population scoring between different times and between processing in samples. Sul de Minas region had higher scores during fermentation in bioreactors. In Três Pontas, mesophilic bacteria increased from 5.91 Log CFU/g at the beginning to 9.71 Log CFU/g in 46 h, while lactic bacteria increased from 4.54 Log CFU/g to 7.17 Log CFU/g, respectively. In Carmo de Minas, the population score of yeast increased from 4.69 Log CFU/g at the beginning to 6.30 Log CFU/g in 21 h. Three hundred and eighty microorganisms were isolated, 149 mesophilic bacteria, 147 lactic acid bacteria, and 84 yeasts. The abundance of each microorganism was calculated in relation to each process of each city. The population of bacteria predominated during the fermentation process in coffees fermented in bioreactors. Diversity of dominant microorganisms were found in coffees from different regions in coffees fermented in bioreactors. Yeasts and specific bacteria were identified in coffees in different regions. *Hanseniaspora opuntiae*, *Torulaspota delbrueckii*, and *Pichia kluyveri* were detected only in the cities based in Carmo de Minas (CM), Três Pontas (TP), Lajinha (LAJ), respectively. In Monte Carmelo (MC), *Saccharomyces cerevisiae* was detected in a large abundance. Bacteria *Zymomonas mobilis* and *Leuconostoc lactis* were detected only in CM. *Acinetobacter johnsonii* and *Enterobacter cloacae* were detected only in the TP region. *Enterobacter hormaechei* was detected only in LAJ. *Bacillus cereus* only in MC. *Hanseniaspora uvarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Weissella cibaria* were detected in all regions. The chemical composition and the sensory profile were influenced as the fermentation process changed. NMR, along with the principal component analysis (PCA), allowed the separation between green coffee beans fermented in bioreactors and control. Lactic acid contributed to the separation; it was detected at high levels. The TDS curves varied with the region and the type of postharvest processing performed. Among the regions studied, in natural coffee in the Cerrado and the pulped coffee in Matas de Minas, caramel and chocolate attributes were dominant and specific, respectively. The caramel and woody attributes were detected only in the Cerrado region, in natural coffee, and pulped coffee, respectively. The dominance of the fruity attribute was common in the Mata de Minas region in the natural coffee and in the Southern region of Minas Gerais pulped coffee. The dominance of the fruity attribute was common in the Mata de Minas region in the natural coffee and in the Southern region of Minas Gerais pulped coffee. Conduction of batch fermentation, closed environment, with oxygen limitation and anaerobiosis induced by epiphytic microbiota affected the microbiota and altered the chemical and sensory composition. The microbiota presented different behavior in different varieties. The diversity in each farm indicated a specific microbiota for the geographic region and influenced the flavors. Among the microbial groups studied, bacteria were the dominant ones throughout the fermentation process conducted in bioreactors. The coffees fermented in

bioreactors presented more chemical compounds precursors of flavors, and aromas were correlated with green coffee, and more sensory attributes were perceived concerning control.

**KEYWORDS:** System closed. Induction to anaerobiosis. Microbiota.

## 1. Introdução

O café é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, e apresenta importância econômica para diversos países produtores e consumidores. A produção mundial de café em 2018/2019 atingiu cerca de 171 milhões de sacas de 60 Kg (ICO, 2019). O Brasil é o maior produtor e exportador de *Coffea arabica* com 53,34 milhões de saca de 60 kg na safra de 2018 (ICO, 2019). Os principais estados brasileiros produtores são Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (CONAB, 2019).

A qualidade do café pode ser influenciada pelos fatores genéticos, condições ambientais, localização geográfica, práticas agrícolas e aspectos pós colheita. (SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014; KREUML et al., 2013; BARBOSA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2005).

Após serem colhidos, os frutos do café podem passar por três tipos de processamento: via seca que produz o café natural; via semi-seca que produz o café descascado (CD) e via úmida, que produz café descascado, despulpado ou desmucilado (BRANDO; BRANDO, 2015). Cada processo apresenta uma etapa de fermentação que poderá influenciar no sabor e aromas característicos da bebida (SCHWAN; WHEALS, 2003). Contudo, nesta etapa, têm-se desenvolvido novas tecnologias que podem proporcionar aumento na qualidade do produto final, como o uso de biorreatores (BRESSANI et al., 2018; BRESSANI et al., 2020).

A fermentação do café é um processo natural que ocorre devido a presença de microrganismos, tais como, leveduras, bactérias e fungos filamentosos que atuam metabolizando os compostos orgânicos presentes no fruto e produzindo metabólitos que contribuirão para o perfil sensorial da bebida (EVANGELISTA et al., 2015; HAILE; KANG, 2019). Assim, o estudo da biodiversidade da microbiota dominante em diferentes regiões torna-se importante por influenciar na qualidade do produto. Além da possibilidade desses microrganismos serem potencialmente utilizados como culturas iniciadoras com a finalidade de melhorar a qualidade do produto, ampliando os atributos sensoriais. (EVANGELISTA et al., 2015).

Entre as tecnologias aplicadas para identificação de compostos químicos, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) têm-se destacado por ser uma técnica rápida e versátil, permitindo identificar vários compostos simultaneamente em uma única análise (LENZ; WILSON, 2007). Esta técnica aliada a análise multivariada de dados, como a Análise dos Componentes Principais (PCA) é uma ferramenta poderosa para classificar

grupos de amostras e caracterizá-las de acordo com as variáveis (OHNO et al., 2011; NAMANJA et al., 2019; DA SILVA et al., 2019; SON et al., 2008).

Métodos enfatizando a fermentação com o objetivo de melhorar a qualidade do café tem sido recentemente reportados, porém tem-se a dificuldade de alcançar o mesmo resultado ao replicar (PEÑUELA-MARTÍNEZ; ZAPATA-ZAPATA; DURANGO-RESTREPO, 2018). Sabe-se que o uso de biorreatores, sistemas fechados, resulta em melhoria na qualidade da bebida (BRESSANI et al., 2018; BRESSANI et al., 2020). No entanto estudos são necessários para investigar a performance microbiológica em distintas fermentações, perfil químico e sensorial de cafés fermentados nesses ambientes. Não obstante, há de se levar em consideração as condições ambientais das diferentes regiões e os microrganismos dominantes específicos em cada região, os quais possivelmente irão influenciar na qualidade da bebida. Faz-se necessário assim investigar a diversidade microbiana, perfil químico e sensorial de cafés fermentados em sistema fechado com indução a anaerobiose pela própria microbiota epifítica.

O objetivo da pesquisa foi investigar a diversidade microbiana em diferentes fermentações utilizando a mesma metodologia, avaliar o perfil químico e sensorial de cafés fermentados em biorreatores obtidos em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Localização das lavouras, procedimentos de colheita e processamento dos cafés

Cafés cereja e despulpado (*Coffea arabica* L.) das variedades Bourbon Amarelo, Catucaí Amarelo e Rubi pertencente a três regiões produtoras em Minas Gerais, Brasil: Cerrado Mineiro (Monte Carmelo), Sul de Minas (Três Pontas e Carmo de Minas) e Matas de Minas (Lajinha) (Tabela 1) foram utilizadas neste trabalho.

Tabela 1- Dados geográficos e ambientais das cidades de amostragem.

Região	Cidade	Latitude*	Longitude*	Altitude (m)	Variedade
Cerrado	MC	18° 48´	47° 27´	963,35	Rubi
Sul de Minas	TP	21° 22´	45° 30´	885	Catucaí Amarelo
	CM	22° 06´	45° 30´	1161	Bourbon Amarelo
Mata de Minas	LAJ	20° 09´	41° 37´	470	Catucaí Amarelo

MC: Monte Carmelo; TP: Três Pontas; CM: Carmo de Minas; LAJ: Lajinha.

Fonte: \*Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: IBGE (2010).

O processo fermentativo foi conduzido em biorreatores de polietileno de alta densidade, cilíndricos com capacidade para 50L (MOTA et al., 2020). Aproximadamente 40L de café natural e descascado foram fermentados espontaneamente em biorreator. O controle foi realizado de acordo com o processamento natural realizado pelos produtores, ou seja, fermentação direto em terreiro suspenso. A temperatura e a concentração de sólidos solúveis (°Brix) foram mensuradas durante a fermentação em intervalos de 12 horas. O processo fermentativo foi finalizado após a estabilização da temperatura (VELMOUROUGANE, 2013; MARTINS et al., 2020). Os grãos foram transferidos para terreiro suspenso até atingir umidade de 11-12%. As amostras coletadas foram armazenadas a -18°C até a realização das análises microbiológicas, químicas e sensorial. As amostras, exceto do tempo inicial (TO), foram retiradas de acordo com a variação da temperatura da massa no interior do biorreator (Tabela 2). As amostras do T0, T1, T2, início de secagem e final de secagem foram utilizadas para análises microbiológicas e em todos tratamentos, final de secagem para análises químicas e sensorial.

Tabela 2 - Tempo e temperatura de fermentação em horas (h) e em (°C).

Cidades	Café natural					Café descascado				
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	
	Temp. (°C)	Temp. (°C)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Temp. (°C)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Tempo (h)
MC	22	26	41	29	52	20	26	41	29	66
TP	18	25	46	30	87	21	23	46	29	67
CM	18	23	21	27	62	18	21	21	27	62
LAJ	25	25	24	29	69	23	22	19	29	66

MC: Monte Carmelo; TP: Três Pontas; CM: Carmo de Minas; LAJ: Lajinha. T0: tempo inicial; T1: tempo de retirada da amostra de acordo com a temperatura no interior do biorreator; T2: tempo final da fermentação de acordo com a estabilização da temperatura; Temp.: temperatura de fermentação.

## 2.2 Análise microbiológica

### 2.2.1 Contagem da população

Dez gramas das amostras de café foram adicionados a 90 mL de água peptonada (1 g/L peptona bacteriológica [Himedia, Mumbai, Índia]) homogeneizados a 100 rpm por 20 min em shaker e preparadas diluições decimais. As bactérias mesofílicas e bactérias ácido-láticas (BAL) foram enumeradas e isoladas em Agar Nutriente (Himedia, Mumbai, Índia) e ágar MRS (Himedia, Mumbai, Índia), respectivamente, contendo 0,4% (v/v) de nistatina (EMS, São Paulo, Brasil) para inibir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos. As placas foram incubadas por 48 h a 28 e 37 °C, respectivamente. Leveduras foram enumeradas e isoladas em ágar YEPG (10 g / L extrato de levedura [Himedia, Mumbai, Índia], 20 g / L glicose (Dinâmica, São Paulo, Brasil), 20 g/L peptona (Himedia, Mumbai, Índia) e 20 g/L ágar (Himedia, Mumbai, Índia) em pH 3,5 para inibição de bactérias e incubadas a 28 °C por 48 h.

Após o período de incubação, foi registrado o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Nas amostras do T1, as colônias foram escolhidas aleatoriamente em um número igual à raiz quadrada do número total de colônias presentes nas placas contadas, buscando garantir que todas as morfologias diferentes das colônias fossem recuperadas em cada caso (VILELA, PEREIRA, SILVA, BATISTA & SCHWAN, 2010).

### 2.2.2 Identificação dos isolados por MALDI-TOF

Bactérias e leveduras isoladas foram identificadas por MALDI-TOF microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Trezentos e oitenta isolados foram cultivados por 18 h em placas usando meio de cultura específico para cada grupo taxonômico. Para análise de bactérias, vinte miligramas da massa celular da placa de cultura foram adicionados a um tubo contendo 6 µL de uma solução orgânica (etanol / acetonitrila/ácido trifluoroacético (10%), 1:1:1). A análise de leveduras, vinte miligramas da massa celular foram adicionados a um tubo contendo 6 µL de ácido fórmico a 25% em água (v/v). Ambas as amostras foram submetidas a homogeneizadas em 30 segundos em vortex. As leveduras foram submetidas a banho de ultrassom por 5 min. O sobrenadante (1 µL) foi adicionado à placa de aço inoxidável do MALDI-TOF. Um µL da solução da matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (10 mg de CHCA/ml de solução orgânica) foi adicionado e misturado suavemente. As amostras foram secas à temperatura ambiente e analisadas por MALDI-TOF. Cada isolado foi analisado em triplicata para medir a qualidade e a reprodutibilidade dos espectros. A calibração foi realizada com a bactéria *Escherichia coli* K12, como descrito por Lima-Neto et al. (2014). *E. coli* foram cultivadas por 18 h em meio de ágar Luria-Bertani (LB) e incubadas a 37 °C por 18 h. Os espectros de massa foram analisados com o software MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) (LIMA-NETO et al., 2014).

### 2.2.3 Extração de DNA de isolados

Cepas representativas de cada cluster gerado pelo Maldi-Tof ou aquelas que não forem passíveis de serem identificadas usando esta técnica (score < 1.7) foram submetidas a análise de identificação molecular.

A extração de DNA dos isolados foi realizada de acordo com Cocolin, Bisson e Mills (2000). As amostras foram amplificadas por PCR e analisadas em gel de agarose a 1%. O DNA foi quantificado usando o instrumento Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop lite spectrophotometer Thermo Scientific, USA) e armazenadas a -20 °C para uso posterior.

### 2.2.4 Identificação molecular

Um total de 93 bactérias e 39 leveduras foram submetidas ao sequenciamento da região do gene 16S rRNA e na região ITS usando os primers ITS, respectivamente. A região do gene 16S rRNA foi amplificada usando os primers 27f (51-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1512R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') (DEVEREUX E WILLIS, 1995). A amplificação na região ITS foi realizada usando os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (NIELSEN et al. 2007).

Os produtos de amplificação foram sequenciados pela Go Genetic (Curitiba, Brasil). As sequências foram alinhadas usando o programa de edição e alinhamento de sequências BioEdit 7.2 e foram comparados com banco de dados do GenBank utilizando o programa Basic Local Alignment Tool (BLAST) (Centro Nacional de Informação de Biotecnologia, Bethesda, MD) para a identificação.

### 2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os compostos químicos foram analisados pela técnica de espectroscopia RMN. Os grãos de café verde e os grãos torrados de todos os tratamentos foram moídos em moinho analítico A11 Basic (IKA, São Paulo, Brasil). As amostras trituradas (10g) foram liofilizadas por 48 h. A extração foi realizada conforme descrito por Kim; Choi; Verpoorte, (2010). Cinquenta mg dos grãos liofilizados e pulverizados foram submetidas à extração com uma combinação de 0.5 mL de solução tampão de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) em água deuterada (D<sub>2</sub>O) (pH 6.0), contendo 0.01 % (p/v) do 2,2,3,3-d<sub>4</sub>-(3-trimetilsilil)-propionato de sódio (TSP-d<sub>4</sub>) como referência interna e 0.5 mL de metanol-d<sub>4</sub>. Posteriormente foram agitadas em vórtex por 1 minuto e em sequência extraídas por 20 minutos em banho de ultrassom e centrifugados a 16000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (0,7 mL) foi adicionado ao tubo de RMN com diâmetro de 5 mm.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram adquiridos em um espectrômetro Bruker AVANCE DRX operando a 400MHz no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química-ICEx da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidos a uma temperatura de 300 K, com janela espectral de 16 ppm, número de pontos 32k, com pré-insaturação do sinal de HDO. Para cada amostra 128 promedições foram coletados, tempo de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 2.6

s 2.0 s, respectivamente A sequência de pulsos com supressão de água ('zgpr') foi usada para adquirir RMN de  $^1\text{H}$ . Para o processamento foi utilizado o alargamento de linha de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de base foram corrigidas automaticamente utilizando o programa Topspin (Bruker Biospin Corporation, Billerica, MA, USA) e, por fim, os espectros foram calibrados pelo sinal do TSP- $d_4$  em 0.00 ppm.

As atribuições dos metabólitos foram realizadas por comparação dos espectros com os dos compostos de referência disponíveis no banco de dados do programa Chenomx Suite 7.0. Além do banco de dados do programa, empregaram-se valores descritos na literatura (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010; SANTOS PIMENTA et al., 2014; WEI et al., 2010; WEI et al., 2012; WEI et al., 2014), e ainda o uso das técnicas *J*-resolvido, HSQC-TOCSY e COSY.

### **2.3.1 Análise estatística multivariada de dados de RMN**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos dos grãos foram transformados para arquivos ASCII pelo programa AMIX (Bruker Biospin Corporation, Billerica, MA, USA). A partir desses arquivos foi construída uma matriz com deslocamento químico ( $\delta$ ) *versus* intensidade. Essa matriz foi submetida ao tratamento multivariado de dados com o método de análise de componentes principais (PCA), empregando-se o *software* Matlab® versão 7 (Mathworks Inc.). Todos os dados foram submetidos à centralização da média e, antes das análises, as regiões  $\delta$  4,75-4,95 e  $\delta$  3,30-3,32 foram removidas para eliminar qualquer variabilidade devida ao sinal da água e do metanol.

### **2.4 Análise sensorial - Temporal Dominance of Sensations (TDS)**

As amostras de café (naturais e descascados) de cada região foram preparadas de acordo com a Specialty Coffee Association of America (SCA, 2019). O café (100 g) foi torrado em uma torrefadora (Probatino, Curitiba, Brasil) e moído em um moinho elétrico (Pinhalense, São Paulo, Brasil). A proporção foi de 8.25 g de café por 150 ml de água. Um painel de três especialistas treinados em café com certificados Q-Grader avaliou as amostras. A temperatura utilizada foi entre 50 e 55° C. A lista de atributos foi definida em um pré-teste com os avaliadores treinados. Os oito atributos mais citados foram selecionados para avaliação no TDS (PINEAU et. al., 2009). Os atributos selecionados pelo painel foram: frutado, amadeirado, vinhoso, chocolate, caramelo, cana de açúcar, herbáceo e açúcar caramelizado. Os participantes ingeriram o café e movimentaram na boca por 3 segundos antes de engolir. A duração da análise

foi 20 segundos para cada amostra. As amostras foram codificadas com três dígitos (PALERMO, 2015) e avaliadas em três repetições. O software utilizado para aquisição de dados foi o SensoMaker, versão 1.8) (NUNES; PINHEIRO, 2012).

## **2.5 Análise estatística**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Um arranjo fatorial triplo  $4 \times 5 \times 2$  de tratamento foi utilizado para analisar os resultados da contagem populacional. Foram estudadas amostras de café originadas de quatro fazendas (individualmente), 5 tempos de fermentações e dois processos de café (café descascado e café natural). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. Os dados foram analisados no software SISVAR (FERREIRA, 2014). A significância foi definida em  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Análises microbiológicas

A temperatura no interior do biorreator variou para cada fazenda (Tabela 3), o que resultou em tempos de fermentação diferentes para completar o processo em cada localidade. A estabilização da temperatura ocorreu ao atingir entre 27 °C e 30 °C indicando o final do processo fermentativo.

Os teores de sólidos solúveis em °Brix (Tabela 3) também variaram apresentando decréscimo em todos os tratamentos. Os valores °Bx variaram entre os processos e entre as regiões. No Cerrado para o processo natural variou de 23° a 21°, no processo CD variou de 27 a 22 °Bx em 41 h de fermentação em ambos processos. Na região Sul ed Minas em Três Pontas para o processo natural variou de 26 a 23 °Bx para o CD variou de 18 a 16 °Bx em 46 h de fermentação, ambos os processos. Em Carmo de Minas variou de para o processo natural 20 a 12 °Bx e para o processo CD variou de 22 a 14 °Bx, 21 h para ambos os processos. Em Matas de Minas para o processo natural variou de 22 a 19 °Bx em 24 h e para o processo CD iniciou com 25 a 24 °Bx, 19 h.

A contagem populacional de bactérias mesofílicas, bactérias lácticas e leveduras estão descritas na Tabela 3. Contagens superiores foram observadas na região Sul de Minas, bactérias mesofílicas e ácido-lácticas na cidade de TP no café natural, enquanto que em Carmo de Minas as contagens de leveduras no café natural foram superiores a população bacteriana.

Houve diferença significativa na população microbiana entre os processos e o tempo de fermentação (Tabela 3). No T1 de fermentação, observou-se populações microbianas superior no processamento natural em relação ao café descascado, atingindo a diferença de 3,05 log UFC/g na contagem populacional das bactérias mesofílicas na cidade de Três Pontas e no Cerrado chegou a 2,46 log UFC/g. Dentre os grupos microbianos nas diferentes regiões, na cidade Três Pontas no tempo de 46 h de fermentação, as contagens de bactérias mesofílicas e bactérias lácticas foram maiores que o tempo inicial e final alcançando 9,17 log UFC/g e 7,14 log UFC/g, respectivamente, para o café natural. No Cerrado, as contagens de bactérias mesofílicas atingiram 7,8 log UFC/g e 5,35 log UFC/g no café natural e descascado, respectivamente. As contagens de BAL diferiram no café natural e descascados atingiram 6,72 e 5,56 log UFC/g, respectivamente. Em Sul de Minas na cidade Carmo de Minas, contagens de bactérias mesofílicas atingiram 5,99 log UFC/g e 4,82 log UFC/g para o café natural e descascado, respectivamente. Enquanto a população de BAL foi de 6,16 log UFC/g e 5,02 log UFC/g para o café natural e descascado, respectivamente, e leveduras atingiram a população

máxima no café natural (6,30 log UFC/g) em comparação com as demais regiões. No decorrer da secagem a contagem da populacional decresceu ou esteve presente em números  $<2$  log UFC/g.

Tabela 3 - Contagem populacional (log UFC/g) de bactérias e leveduras, tempo de fermentação, teor de sólidos solúveis totais, temperatura ambiente e temperatura de fermentação em quatro cidades.

Cidade	Proc.	Tempo de ferm. (h)		° Brix**		TA (°C)		TF (°C)**		BM		BAL		Leveduras	
		Nat	CD	Nat	CD	Nat	CD	Nat	CD	Nat	CD	Nat	CD	Nat	CD
MC	Ferm.	0	0	23	27	22	22	20	4,80 <sup>bB</sup>	6,09 <sup>bA</sup>	3,55 <sup>dB</sup>	4,55 <sup>bA</sup>	<2,00 <sup>cB</sup>	3,51 <sup>cA</sup>	
		41	41	21	22	25	26	26	7,81 <sup>aA</sup>	5,35 <sup>aB</sup>	6,72 <sup>aA</sup>	5,56 <sup>aB</sup>	3,38 <sup>bB</sup>	3,23 <sup>bA</sup>	
		52	66	***	***	22	29	29	3,88 <sup>cB</sup>	4,36 <sup>cA</sup>	3,73 <sup>cB</sup>	4,18 <sup>cA</sup>	3,80 <sup>aA</sup>	3,81 <sup>bA</sup>	
	Secagem	I <sup>a</sup>	I <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	4,62 <sup>bB</sup>	5,53 <sup>aA</sup>	4,64 <sup>bA</sup>	4,23 <sup>cB</sup>	3,78 <sup>aB</sup>	3,96 <sup>aA</sup>	
		F <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	<2,00 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>dA</sup>	3,42 <sup>eA</sup>	<2,00 <sup>dB</sup>	<2,00 <sup>cA</sup>	<2,00 <sup>dA</sup>	
TP	Ferm.	0	0	26	18	22	18	21	5,91 <sup>cB</sup>	6,06 <sup>bA</sup>	4,54 <sup>cB</sup>	5,29 <sup>aA</sup>	3,78 <sup>cB</sup>	4,76 <sup>aA</sup>	
		46	46	23	16	25	25	23	9,17 <sup>aA</sup>	6,12 <sup>bB</sup>	7,14 <sup>aA</sup>	5,36 <sup>aB</sup>	5,98 <sup>aA</sup>	3,93 <sup>bB</sup>	
		87	67	***	***	25	30	29	6,39 <sup>aB</sup>	5,75 <sup>bA</sup>	6,16 <sup>bA</sup>	5,42 <sup>aB</sup>	5,69 <sup>aA</sup>	3,83 <sup>bB</sup>	
	Secagem	I <sup>a</sup>	I <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	6,46 <sup>bB</sup>	8,71 <sup>aA</sup>	6,21 <sup>bA</sup>	3,87 <sup>bB</sup>	4,43 <sup>bA</sup>	3,67 <sup>bB</sup>	
		F <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	4,66 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>cB</sup>	<2,00 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>cA</sup>	<2,00 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>cA</sup>	
CM	Ferm.	0	0	20	22	17	18	18	5,83 <sup>bB</sup>	5,94 <sup>aA</sup>	4,97 <sup>bA</sup>	4,87 <sup>aA</sup>	4,69 <sup>cB</sup>	3,89 <sup>dA</sup>	
		21	21	12	14	18	23	21	5,99 <sup>aA</sup>	4,82 <sup>bB</sup>	6,16 <sup>aA</sup>	4,96 <sup>aB</sup>	6,30 <sup>aA</sup>	4,59 <sup>bB</sup>	
		62	62	***	***	20	27	27	4,71 <sup>cA</sup>	4,72 <sup>cA</sup>	4,62 <sup>cA</sup>	3,45 <sup>cB</sup>	5,85 <sup>bA</sup>	4,97 <sup>aB</sup>	
	Secagem	I <sup>a</sup>	I <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	3,78 <sup>dB</sup>	4,63 <sup>dA</sup>	4,90 <sup>bA</sup>	3,89 <sup>bB</sup>	3,75 <sup>bB</sup>	4,04 <sup>cA</sup>	
		F <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	<2,00 <sup>eA</sup>	<2,00 <sup>eA</sup>	<2,00 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>dA</sup>	3,48 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>eB</sup>	
LAJ	Ferm.	0	0	22	25	21	25	23	5,32 <sup>aB</sup>	5,89 <sup>aA</sup>	3,45 <sup>cB</sup>	6,72 <sup>aA</sup>	<2,00 <sup>bB</sup>	3,73 <sup>bA</sup>	
		24	19	19	24	27	25	22	3,94 <sup>cB</sup>	5,66 <sup>aA</sup>	3,67 <sup>bB</sup>	5,73 <sup>bA</sup>	<2,00 <sup>bB</sup>	3,98 <sup>bA</sup>	
		69	66	***	***	29	29	27	3,82 <sup>cB</sup>	5,61 <sup>aA</sup>	6,07 <sup>aA</sup>	5,53 <sup>cB</sup>	4,70 <sup>aA</sup>	4,83 <sup>aA</sup>	
	Secagem	I <sup>a</sup>	I <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	4,76 <sup>bB</sup>	5,99 <sup>aA</sup>	3,66 <sup>bB</sup>	5,13 <sup>dA</sup>	4,83 <sup>aA</sup>	4,95 <sup>aA</sup>	
		F <sup>a</sup>	F <sup>a</sup>	***	***	*	*	*	<2,00 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>bA</sup>	<2,00 <sup>dA</sup>	<2,00 <sup>eA</sup>	4,95 <sup>aA</sup>	<2,00 <sup>cB</sup>	

Proc.: processo; Ferm.: fermentação; TF: temperatura de fermentação; TA: temperatura ambiente; BM: bactérias mesofílicas; BAL: bactérias ácido-láticas; MC: Monte Carmelo; TP: Três Pontas; CM: Carmo de Minas; LAJ: Lajinha. Nat: café natural. CD: café descascado. I: início; F: final.

Os dados são exibidos como média. As médias seguidas de letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem significativamente para o teste Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).

\* não avaliado. \*\* Dados médios de tratamentos. \*\*\* não detectado.

<sup>a</sup> Tempo inicial de secagem e tempo final de secagem não avaliado.

Trezentos e oitenta microrganismos foram isolados, 149 pertencentes a bactérias mesofílicas, 147 Bactérias ácido-láticas e 84 leveduras. A Figura 1 mostra identificação molecular e abundância da microbiota dominante de cafés de diferentes regiões. As cepas identificadas por MALDI-TOF e confirmada pelo sequenciamento do DNA, foram depositadas na Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA), Lavras, Minas Gerais, Brasil. A abundância de cada microrganismo foi calculada em relação a cada processo de cada cidade. As bactérias identificadas pertencem ao filo *Firmicutes*, *Proteobacterias* e *Actinobacterias*. Em ambos os processos, houve predominância do filo *Firmicutes* representados pelos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* e *Weissella*,

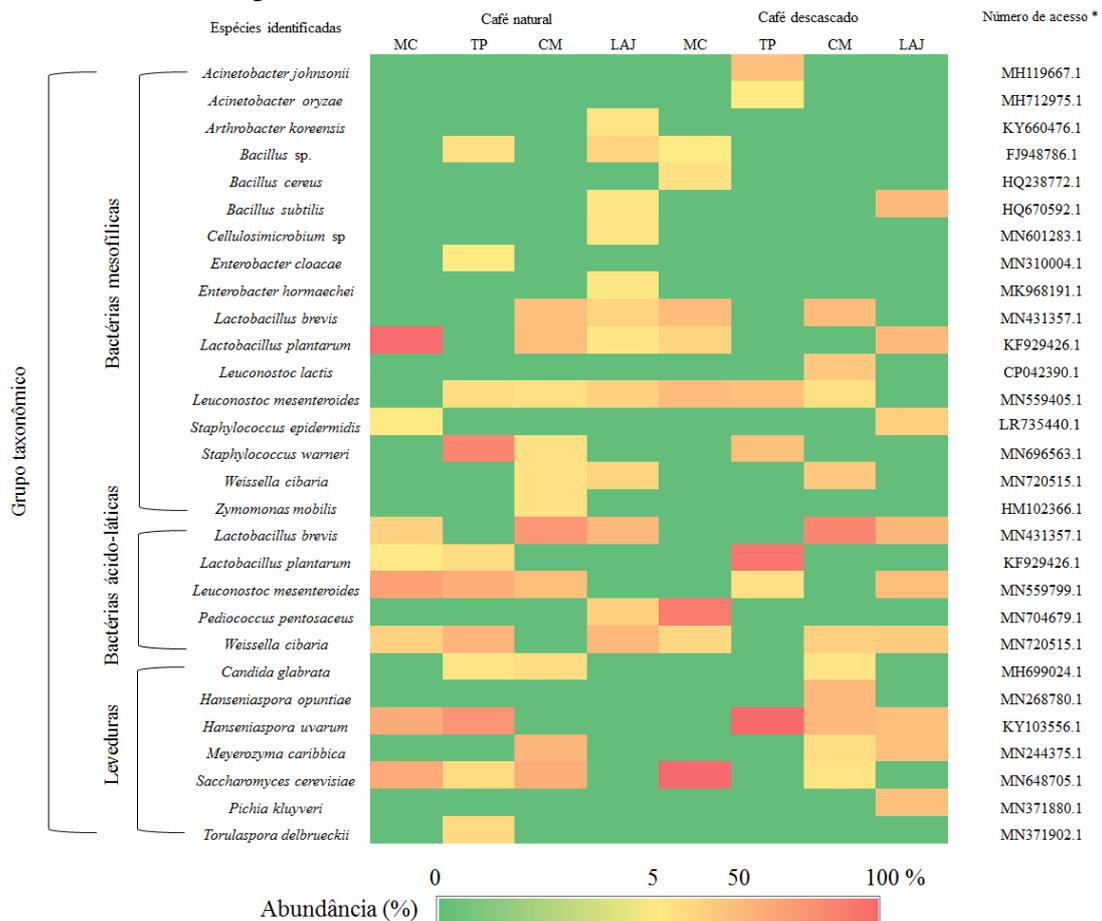
Dezessete espécies de bactérias mesofílicas foram identificadas pertencentes a 10 gêneros. Algumas espécies foram encontradas somente no café natural: *Arthrobacter koreensis*, *Cellulosimicrobium* sp, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Zymomonas mobilis*. Outras espécies foram detectadas apenas no processo CD: *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter oryzae*, *Bacillus cereus* e *Leuconostoc lactis*. Mais espécies de bactérias foram detectadas no café natural em relação ao CD (Figura 1). A maior diversidade de espécies de bactérias mesofílicas identificadas no café natural foi em Matas de Minas e no CD foi no Cerrado. (Figura 1). No processo natural foram detectadas população máxima de *Lactobacillus plantarum* e *Staphylococcus warneri* na região do Cerrado (7,91 log UFC/g) e em Três Pontas (8,87 log UFC/g) na região Sul de Minas, respectivamente. As espécies *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum* foram predominantes, atingiram 5,93 e 5,94 log UFC/g, respectivamente em Carmo de Minas na região Sul de Minas. No processo CD *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* foram as espécies dominantes atingiram 4,62 log UFC/g em Matas de Minas (Figura 2).

Cinco espécies de bactérias ácido-láticas foram detectadas em ambos processos, café natural e café CD: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* e *Weissella cibbaria*. A maior diversidade de espécies de bactérias ácido-láticas foi encontrada no Cerrado no processo natural e no processo CD foi em Matas de Minas. Na cidade em Carmo de Minas na região Sul de Minas a espécie *Lactobacillus brevis* apresentou maior abundância no café natural e café CD. A espécie *Leuconostoc mesenteroides* predominou no café natural na região Cerrado (7,11 log UFC/g) e Sul de Minas em Três Pontas (7,50 log UFC/g) e em Carmo de Minas (5,95 log UFC/g) e no processo CD na região Matas de Minas (4,56 log UFC/g).

Sete espécies de leveduras foram identificadas pertencentes a 6 gêneros. *Torulaspora delbrueckii* foi encontrada apenas no café natural. *Hanseniaspora opuntiae* e *Pichia kluyveri*

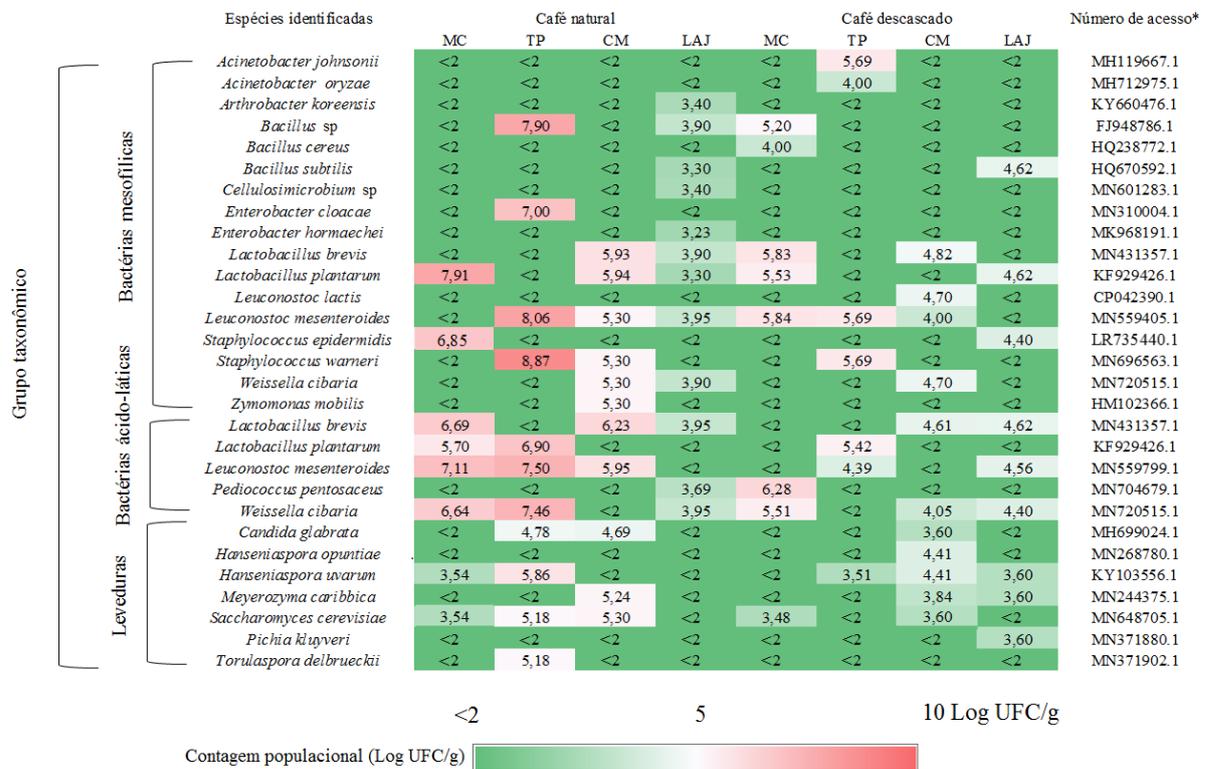
foram detectadas apenas no café descascado. A maior diversidade de espécies de leveduras foi detectada na região Sul de Minas, na cidade de Três Pontas no café natural e em Carmo de Minas no café CD (Figura 1). A levedura *Hanseniaspora uvarum* esteve presente em ambos os processos na cidade de Três Pontas com abundância superior a 50%. *Saccharomyces cerevisiae* foi detectada em maior abundância em CD no Cerrado. No processo natural foram encontradas população máxima das espécies *Hanseniaspora uvarum* e *Saccharomyces cerevisiae* predominaram no Cerrado, ambas atingiram 3,54 log UFC/g. Na região Sul de Minas, em Três Pontas *Hanseniaspora uvarum* e em Carmo de Minas *Saccharomyces cerevisiae* ocorreram em maior população atingiram, respectivamente 5,86 log UFC/g e 5,30 log UFC/g. No processo CD *Hanseniaspora uvarum*, *Meyerozyma caribbica* e *Pichia kluyveri* predominaram com população de 3,60 log UFC/g em Matas de Minas.

Figura 1 - Heatmap das espécies de bactérias e leveduras presentes no café natural e descascado no T1 de fermentação conduzida em sistema de batelada fechado, sem adição de água e anaerobiose induzida, identificadas pelo sequenciamento. A escala é mostrada no final da imagem.



\*Número de acesso ao banco de dados Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);  
 MC: Monte Carmelo (Cerrado); TP: Três Pontas (Sul de Minas); CM: Carmo de Minas (Sul de Minas); LAJ: Lajinha (Matas de Minas).

Figura 2 - Heatmap da contagem populacional (log UFC/g) das espécies de bactérias e leveduras presentes no café natural e descascado no T1 de fermentação conduzida em sistema de batelada fechado, sem adição de água e anaerobiose induzida, identificadas pelo sequenciamento. A escala é mostrada no final da imagem.



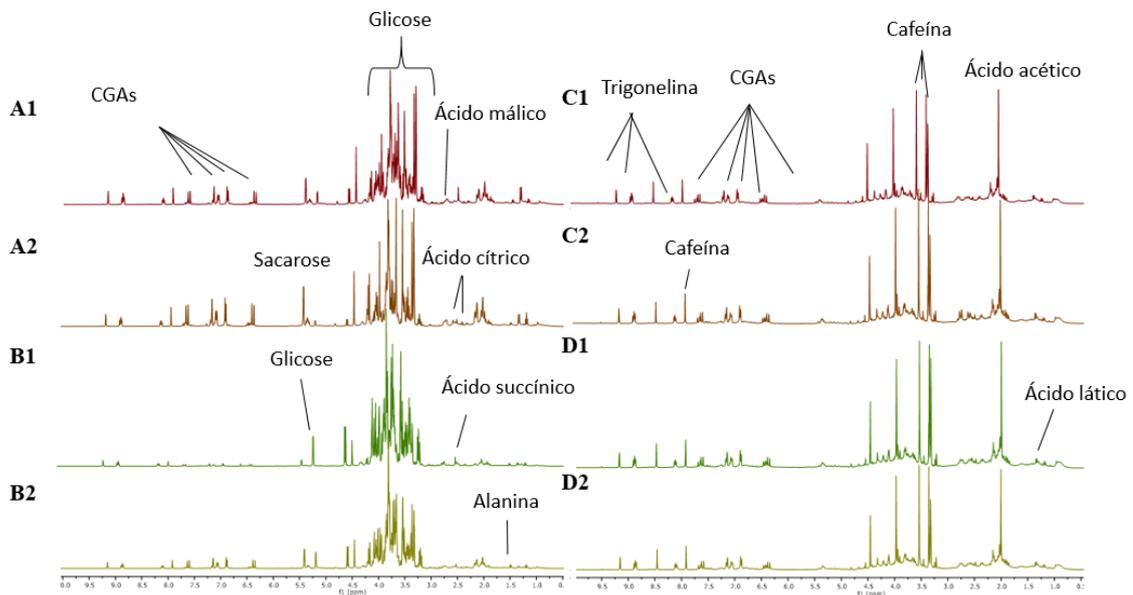
\*Número de acesso ao banco de dados Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);

MC: Monte Carmelo (Cerrado); TP: Três Pontas (Sul de Minas); CM: Carmo de Minas (Sul de Minas); LAJ: Lajinha (Matas de Minas).

## 2 Composição química

Os espectros representativos unidimensionais (1D) de RMN de  $^1\text{H}$  para café verde e grão torrado estão apresentados na Figura 3. Os espectros de café apresentaram sinais característicos de vários compostos como alanina ( $\delta$  1,48), ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) ( $\delta$  1,90; 2,32; 3,01), sacarose ( $\delta$  5,39), glicose ( $\delta$  5,17; 4,58), glicina ( $\delta$  3,55), ácido cítrico ( $\delta$  2,74; 2,56), ácido succínico ( $\delta$  2,53), cafeína ( $\delta$  7,91), trigonelina ( $\delta$  8,86; 4,45), ácido fórmico ( $\delta$  8,46), ácido clorogênico (CGAs) ( $\delta$  7,60 H-7', 6,36 H-8'), ácido málico ( $\delta$  4,31; 2,74; 2,66), ácido láctico ( $\delta$  1,34).

Figura 3 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz de cafés fermentados em biorreatores e controle de Matas de Minas.

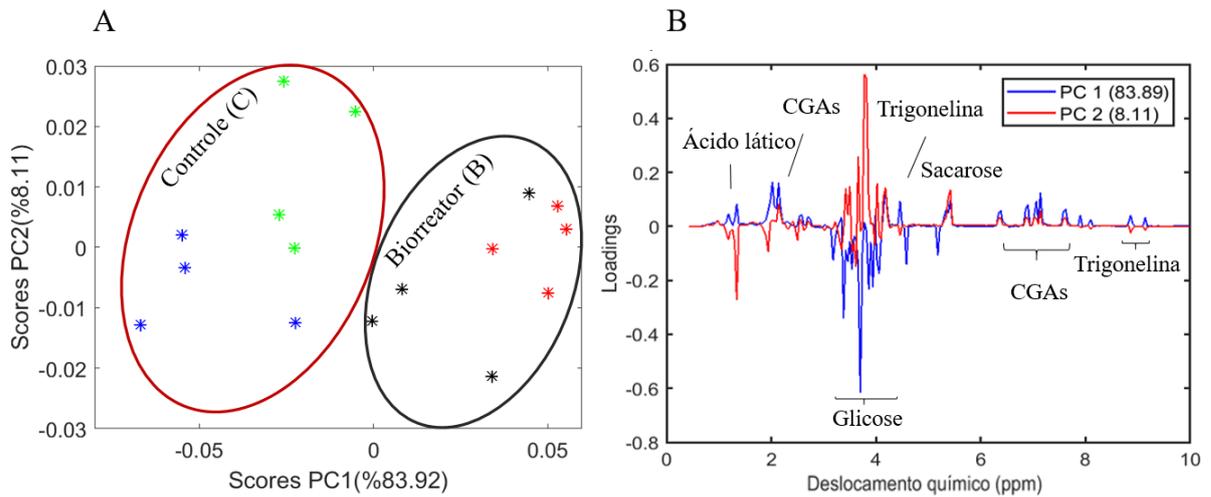


Grão verde - Biorreator (A); controle (B); Grão torrado - (C) Biorreator (D) controle; 1 – café natural; 2 – café descascado. CGAs: Ácido clorogênico.

Para avaliar diferenças no conteúdo metabólico, os dados foram analisados por quimiometria. Com a finalidade de diferenciar os tratamentos nos distintos processos fermentativos de café foi realizado a Análise dos Componentes Principais (PCA) (Figura 4). O gráfico de scores (Figura 4A) revelou discriminação dos grãos verdes provenientes de fermentação conduzida em biorreatores em relação ao controle. A componente principal PC1 explicou 83,9% da variância dos dados, os cafés fermentados em biorreatores foram agrupados em valores positivos de PC1, enquanto o controle se concentrou nos valores negativos de PC1.

No gráfico de “loadings” (pesos) (Figura 4B) mostra-se variáveis importantes na diferenciação das amostras em relação ao PC1. A seção superior do gráfico de pesos de PCA indica níveis relativamente mais altos de compostos químicos em cafés fermentados em biorreatores em comparação com o controle, enquanto a seção inferior indica níveis mais baixos (KO et al., 2009; SON et al., 2008). A diferenciação ocorreu pelo aumento nas ressonâncias nos compostos químicos: ácido clorogênico, ácido láctico, sacarose e trigonelina nos cafés fermentados em biorreatores. Além disso, ocorreu aumento na ressonância da glicose no controle que contribuiu para o agrupamento. A ação da microbiota modificou a composição química, os cafés fermentados em biorreatores apresentaram mais compostos precursores de aroma e sabor do que o controle.

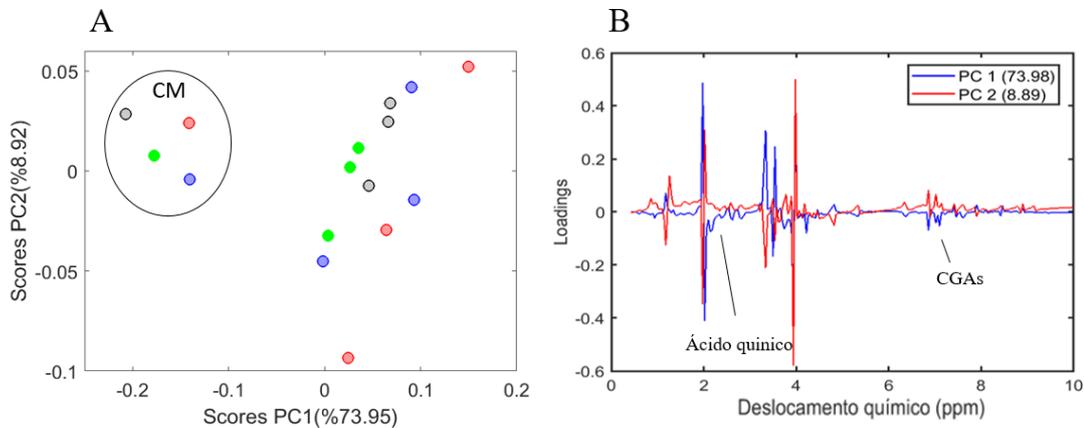
Figura 4 - Gráfico de scores (A) e loadings (B) de PCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  DE 400 MHz de grãos verdes do café natural e descascado.



Café natural – Biorreator \* ; café descascado – Biorreator \* : café natural – controle \* ; café descascado – controle \* CGAs: Ácido clorogênico

Para os grãos torrados, a PCA (explicou 82,87% da variância) foi realizada para destacar possíveis agrupamentos de amostras de acordo com os tratamentos. Não foi possível destacar compostos químicos para diferenciação das amostras entre os tratamentos, porém observa-se no gráfico de pesos (Figura 5B) um agrupamento em PC1 negativo (73,95% da variância total) dos diferentes tratamentos da cidade em Carmo de Minas na região Sul de Minas. Os compostos químicos ácido clorogênico e ácido quínico estiveram relacionados aos cafés da Região Sul de Minas em Carmo de Minas.

Figura 5 - Gráfico de scores (A) e loadings (B) de PCA dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  DE 400 MHz de grãos torrados do café natural e descascado.



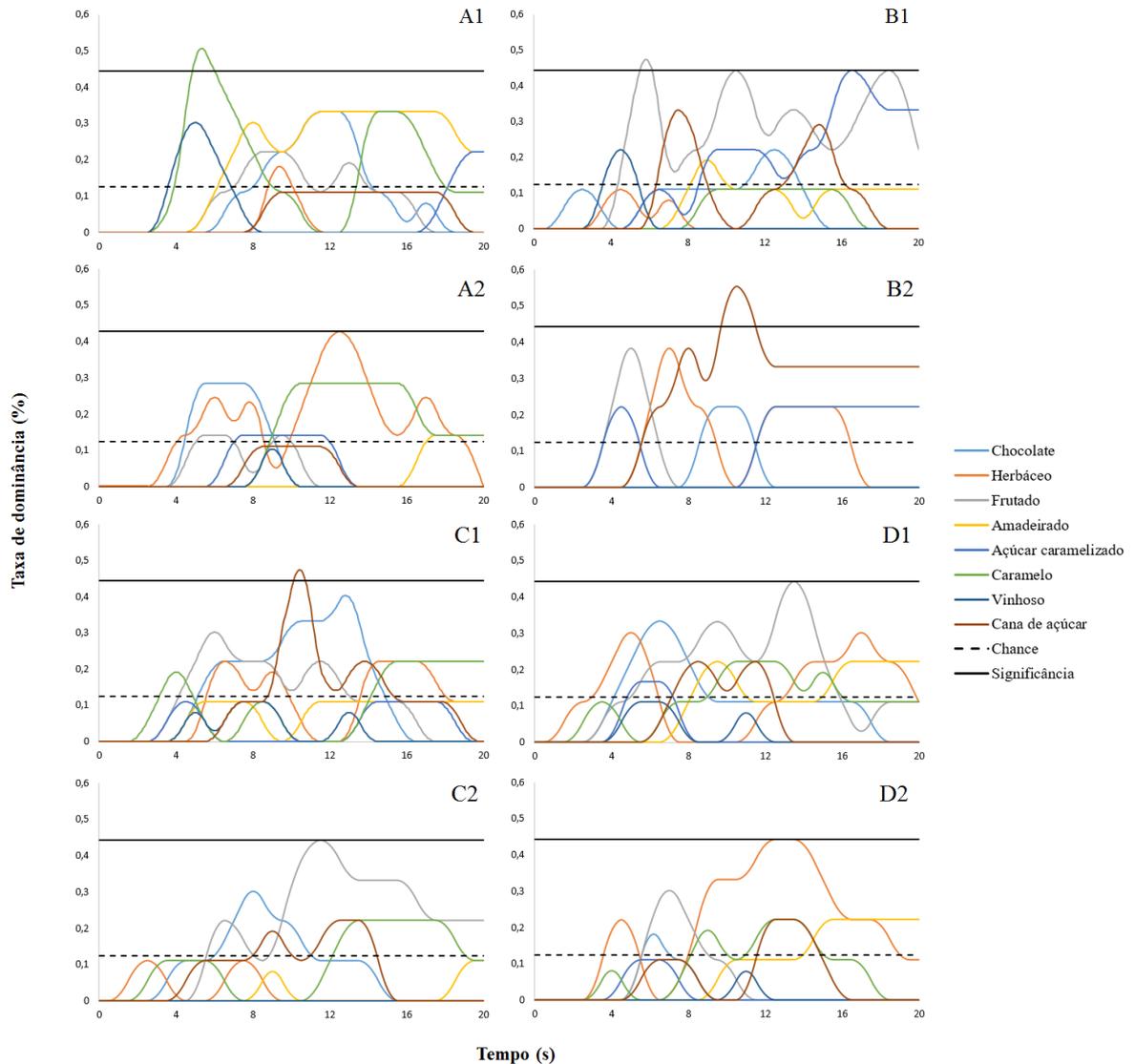
Café natural – Biorreator  ; café descascado – Biorreator  : café natural – controle  ; café descascado – controle  ; CM – Carmo de Minas. CGAs: Ácido clorogênico

### 3.3 Análise sensorial

As curvas de Dominância Temporal das Sensações (TDS) em diferentes fazendas são apresentadas nas figuras 6 e 7. Cada região apresentou atributos dominantes e diferentes entre elas no café natural e CD no tratamento em biorreator e no controle.

O perfil sensorial no café natural apresentou peculiaridades. A região Cerrado apresentou dominância do atributo caramelo (4,8 a 6,1 s) diferente das demais regiões. Os atributos dominantes frutado (5,6 a 6,3 s e 10,5 e 18,6 s) e açúcar caramelizado (16,5 s) foram percebidos, em conjunto, somente na região Sul de Minas em Carmo de Minas. No entanto, o atributo cana-de-açúcar foi percebido na região Sul de Minas em Três Pontas (10,1 a 10,7 s) e em Carmo de Minas (9,7 e 11,6 s), frutado em Matas de Minas (13,5 s) e em Três Pontas (11,6 s), herbáceo em Monte Carmelo (12,5 s) e Matas de Minas (entre 12,4 e 13,7) ambas no controle.

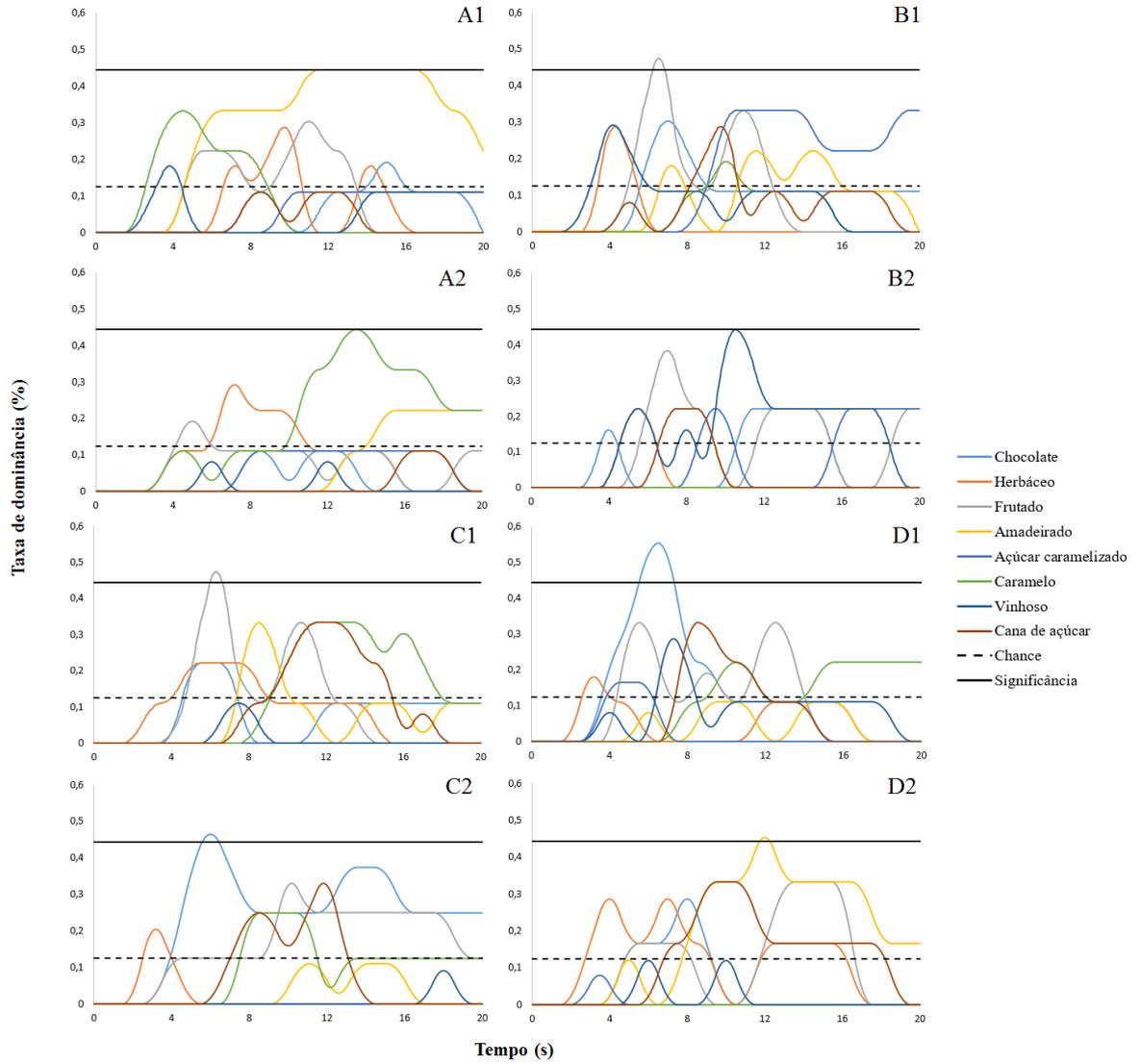
Figura 6 - Curvas de Dominância Temporal das sensações (TDS) em café natural.



Cerrado (A); Sul de Minas, Carmo de Minas (B); Sul de Minas, Três Pontas (C); Matas de Minas, Lajinha (D); biorreator (1) e controle (2).

O tratamento com café descascado apresentou diferentes atributos. Somente na região de Monte Carmelo o atributo caramelo (11,6 a 16,8 s) foi detectado no controle. O atributo frutado foi percebido em dominância na região Sul de Minas em Três Pontas (6,2 a 6,7 s) e em Carmo de Minas (6,4 a 7 s), amadeirado no Cerrado (11,6 a 16,8 s) e no controle em Matas de Minas (11,9 a 12,3 s) e chocolate (entre 5,6 e 13,6 s) em Matas de Minas e no controle em Sul de Minas na cidade de Três Pontas (5,5 e 6,5 s).

Figura 7 - Curvas de Dominância Temporal das sensações (TDS) em café descascado.



#### 4. Discussão

O processo fermentativo de café ocorre de forma espontânea pelos microrganismos epifíticos presentes no fruto. Bactérias e leveduras são predominantes na fermentação de café e foram estudadas nos processamentos utilizados na pós-colheita (AGATE; BHAT, 1966; SILVA et al., 2000; SILVIA et al., 2008; VILELA et al., 2010; EVANGELISTA et al., 2015; MASOUD et al., 2004). No entanto, estudos sobre a condução da fermentação em diferentes ambientes em biorreatores com indução a anaerobiose pela própria microbiota epifítica ainda não foram relatados.

A população de bactérias foi predominante durante todo o processo fermentativo de café conduzido em sistema de anaerobiose induzida (Tabela 3) e apresentaram maior diversidade de espécies em relação as leveduras (Figura 1). Alguns autores demonstraram que nos processamentos seco e semi-seco sem a utilização de biorreatores, contagens superiores de bactérias foram encontradas no tempo inicial de fermentação e no decorrer do processo as leveduras tiveram contagens superiores (SILVA et al., 2008; VILELA et al., 2010). Pode-se inferir que as condições dentro do biorreator, tais como temperatura, oxigênio e atividade de água podem ter favorecido a predominância do grupo de bactérias. Diferenças nos teores de umidade e a composição química do grão também afetam a competição pelo substrato e consequentemente na distribuição da população microbiana (SILVA, et al., 2008).

A população microbiana foi afetada de acordo com o processo utilizado. Do início da fermentação ao T1 no processo natural houve aumento da contagem populacional, no entanto, para o café descascado houve decréscimo. Os resultados estão de acordo com os estudos de Martins et al. (2020) em café fermentado em sistema fechado em anaerobiose pela microbiota epifítica e sem utilização de água em diferentes altitudes. Assim, no T1 de fermentação, a contagem populacional foi superior no processamento natural em relação ao café descascado. Em virtude da utilização do fruto inteiro, o café natural apresenta maior teor de mucilagem e polpa para o desenvolvimento e permanência dos microrganismos (BORÉM, 2008).

Diferenças entre as contagens de microrganismos em cada região foram detectadas (Tabela 3). Além da temperatura, umidade, composição da polpa, a variedade (SILVA et al., 2008) e altitude (LEONG et al., 2014; MARTINS et al., 2020) também influenciaram a microbiota. A população máxima de bactérias foi detectada na variedade Catucaí Amarelo seguida pela Rubi nas regiões a 885 a 936,35 m de altitude, respectivamente. A população de leveduras atingiu contagem máxima em 1.161 m de altitude na variedade Bourbon Amarelo. Os resultados estão de acordo com a pesquisa de Martins (2020), a população máxima

de leveduras (6,5 log UFC/g) foi detectado em 1.200 m de altitude no café natural. A população máxima de bactérias mesofílicas (9,5 log UFC/g) foi detectada a 900 m de altitude, no entanto as BAL variaram nas diferentes altitudes (800, 1000 e 1.200 m). Os autores relataram que a diferença pode estar relacionada a altitude e outros fatores como temperatura, oxigênio, acidez e alcalinidade. Houve aumento na população de BAL durante o processo fermentativo, as condições de fermentação proporcionaram o crescimento populacional deste grupo microbiano devido a baixa disponibilidade de oxigênio (BRESSANI et al., 2018). Evidenciou-se que as diferentes variedades e as condições ambientais afetaram a população de microrganismos. Em cada região apresentou tempos de fermentação diferentes que foram determinados pela variação da temperatura no interior da massa. As diferentes variedades, e teor de sólidos solúveis, alteraram a microbiota e conseqüentemente a variação da temperatura nos biorreatores. Durante o processo fermentativo de cafés, quando a temperatura máxima de fermentação foi atingida simultaneamente foi detectado maior contagem populacional de microrganismos (VELMOUROUGANE, 2013).

No final da fermentação, a temperatura média no interior da massa de café nas regiões estudadas variou de 26 a 30 °C, a temperatura é um parâmetro de referência para determinar a finalização da fermentação nos biorreatores. Durante o processo ocorre o aumento da temperatura na massa do café devido as reações exotérmicas dos microrganismos presentes (JACKELS; JACKLS, 2005), em conjunto de outros fatores irão determinar o tempo de fermentação. A temperatura caracteriza o final do processo fermentativo devido ao decréscimo populacional dos microrganismos, após este período ocorre diminuição da qualidade da bebida (VELMOUROUGANE, 2013). Por isso, é importante o controle do processo de fermentação, pois pode-se obter atributos desejáveis e evitar atributos indesejáveis (LEE et al., 2015).

Durante a secagem, nos dois processos, café natural e café descascado a contagem populacional decresceu ou ficou abaixo do limite de detecção (<2 log UFC/g) devido a umidade atingir 11% o que não favorece o crescimento microbiano (BRANDO; BRANDO, 2015).

As bactérias mesofílicas foram detectadas com maior abundância no café natural e descascado. Na região Sul de Minas, na cidade de Três Pontas *Staphylococcus warneri* se destacou (8,87 log UFC/g) no processo de café natural, no entanto também esteve presente no café descascado atingindo 5,69 log UFC/g. Também foi detectado no café natural em Carmo de Minas com contagem populacional de 5,30 log UFC/g. Nos estudos de Evangelista et al., (2015), essa bactéria foi detectada em predominância em processo fermentativo de café em uma fazenda em Lavras na Região Sul de Minas. A sua atividade na fermentação do café ainda não é esclarecida. *Staphylococcus warneri* integra o grupo estafilococos coagulase negativo, esses,

tem sido relatado em fermentação de carnes e contribuem para o sabor pelo metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos (MAINAR et al., 2017).

As espécies *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella cibaria* foram detectadas em ambos os processos. Essas bactérias foram relatadas na literatura em diferentes processamento fermentativo de café (EVANGELISTA et al., 2015; VILELA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2018). A espécie *B. subtilis* foi caracterizado por apresentar atividade pectinolítica com capacidade de degradar a polpa e mucilagem dos frutos e reportada pela produção de ácidos orgânicos como ácido succínico (SILVA et al. 2013). *L. brevis* e *L. plantarum* são bactérias ácido-láticas também reportadas por apresentar atividade pectinolítica (AVALLONE et al., 2002). *L. plantarum* foi relatada como uma das bactérias predominante durante o processo de fermentação de café pelo processamento semi-seco (VILELA et al., 2010).

Independente da região analisada os gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* estiveram presentes. Esses microrganismos são comumente encontrados em processos fermentativos de café (DE BRUYN. et al., 2017; DE CARVALHO NETO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018; DE OLIVEIRA JUNQUEIRA et al., 2019; MARTINS et al 2020). No presente estudo, *Pediococcus pentosaceus* foi isolada pela primeira vez em fermentação de café, detectada no Cerrado e Matas de Minas, portanto, não há relatos disponíveis sobre o efeito dessa bactéria no processo fermentativo de café. Essa espécie homofermentativa é relatada na literatura pela sua capacidade de produzir substâncias inibidoras como as bacteriocinas (BAGENDA et al., 2008; ANASTASIADOU et al., 2008; SADISHKUMAR; JEEVARATNAM, 2018; VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2013).

A distribuição de BAL podem ser afetadas pela altitude e clima, assim, encontra-se diversidades variadas em diferentes altitudes (LEONG et al., 2014). Neste estudo, a distribuição das BAL pode ter sido afetada pela altitude e processos. Nas regiões localizadas em altitude a 963,35 e 885 m de altitude *L. brevis* foi detectada somente no café natural no Cerrado, no entanto *P. pentosaceus* foi detectada apenas no café descascado no Cerrado e no café descascado a população foi diferente nas duas cidades. A bactéria *Leuconostoc lactis* foi encontrada somente na região localizada a 1.161 m de altitude no café descascado. As BAL, além de auxiliar na remoção da polpa de café, contribuem para a redução de pH, acidifica o meio e evita a sobrevivência de microrganismos patógenos (HOLZAPFEL; WOOD, 2014).

As leveduras são estudadas devido ao desempenho na fermentação e na produção de compostos voláteis formadores de precursores de aroma e sabor, influenciando positivamente na qualidade da bebida (EVANGELISTA et al., 2014a; EVANGELISTA et al., 2014b;

RIBEIRO et al., 2017). Os gêneros de leveduras detectadas foram *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulaspota*, *Meyerozyma* e *Hanseniaspora*. Essas leveduras são frequentemente relatados como produtores de enzimas pectinolíticas (MASOUD; JESPERSEN, 2006a; FENG et al. 2016; AGATE; BHAT, 1966; SILVA et al. 2008). A espécie *Hanseniaspora uvarum* foi comum em todas as regiões estudadas. *H. uvarum* foi detectada em processamento semi-seco (MASOUD et al., 2004) e em processamento úmido como predominante (ELHALIS et al., 2020). *Saccharomyces cerevisiae* foi detectada com maior abundância no Cerrado. Essa espécie produz metabólitos que podem conferir qualidade na bebida de café (SILVA et al., 2013), no entanto tem sido relatada ser dependente da cepa (RIBEIRO, et. al., 2017).

Bactérias e leveduras isoladas no tempo de 12 h à 48 h de fermentação predominam o processo fermentativo no café (VILELA et. al., 2010; ELHALIS et al., 2020). Microrganismos que dominam no processo fermentativo tem sido usado como culturas iniciadoras que por sua vez são cepas que possuem a capacidade de produzir álcoois e ácidos, além de outras propriedades, que fornecem características positiva na bebida (MARTINEZ et al., 2019). A diversidade em cada cidade indicou microbiota específica para a região geográfica e pode influenciar na composição química e nos sabores de cafés. *Pichia kluyveri* foi detectada somente na região de Matas de Minas e apresentou dominância no processo fermentativo poderia ser utilizada como cultura iniciadora em café nesta localidade. Essa espécie foi relatada como alta produtora da enzima poligalacturonase (PG) e podem degradar a pectina no processo fermentativo de café além de estar relacionada com a inibição de crescimento e produção de ocratoxina A (OTA) (MASOUD; JESPERSEN, 2006a; MASOUD; KALTOFT, 2006b). Na região Sul de Minas *Torulaspota delbrueckii* foi detectada somente em Três Pontas e nesta mesma cidade *H. uvarum* foi predominante. Em Carmo de Minas *Saccharomyces cerevisiae* foi detectada em dominância no processo, portanto essas leveduras poderiam ser utilizadas como cultura iniciadora nesta região, podem apresentar capacidade pectinolítica e produção de compostos desejáveis (SILVA et al., 2013). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* também poderia ser utilizada como cultura iniciadora na região Cerrado, esteve em predominância.

O ácido clorogênico, a trigonelina juntamente com a sacarose são precursores de aroma e sabor relacionados com a qualidade da bebida final (DE MARIA et al., 1994). O ácido clorogênico faz parte do grupo dos compostos fenólico gera ácidos fenólicos livres (FARAH; DONANGELO, 2006). A trigonelina gera piridina, alquil-piridinas e pirróis caracterizados com características de sabores apreciáveis (VIANI; HORMAN, 1974; YANG et al., 2016). A sacarose participa das reações Maillard durante o processo de torrefação conferindo as características de aroma e cor (FLAMENT, 2002). A variedade do café influencia na

concentração de cafeína, ácido clorogênico e sacarose nos diferentes processamentos (TOLESSA et al., 2019). A trigonelina esteve relacionada aos cafés fermentados em biorreatores em altos níveis em relação ao controle. O mesmo foi observado por Martinez et al., (2017) e por Bressani et al., (2018) onde os cafés fermentados em bioreatores de poliestireno apresentaram maior concentração em relação aos cafés que não passaram por este tratamento. Quanto a diferença entre os níveis de sacarose nos tratamentos, altos níveis de sacarose em cafés fermentado em biorreatores pode estar relacionado com atividade de uma enzima endógena, a sacarose fosfato sintase, auxiliando na importação e mobilização de carboidratos (WENDLER et al., 1990). Os microrganismos podem ter contribuído para a ação desta enzima devido a alteração do pH pela produção de ácidos (RIBEIRO et al., 2018). A presença da sacarose em grãos verdes foi correlacionada positivamente com cafés com as melhores características sensoriais e maior acidez, e tem sido relatado como importante precursor do sabor e aroma (BORÉM et al., 2016). Ao comparar compostos químicos de cafés especiais e comerciais, Know e colaboradores (2015) encontraram maiores teores de sacarose em cafés especiais e a presença deste composto esteve relacionado positivamente com cafés de qualidade.

Diferenças entre os níveis de ácido clorogênico foram encontrados em grão verde de *Coffea arabica* variedade Catuaí Amarelo, houve aumento durante a fermentação de café fermentado em biorreatores processados pelo método semi-seco (MARTINEZ et al., 2017). A presença deste ácido está relacionada ao estágio final de maturação do fruto. O ácido clorogênico é deslocado do interior do fruto para a parte externa, devido ao mecanismo de defesa contra o ataque de microrganismos (FAGAN et al., 2011). A concentração do CGA em grãos verdes é afetado de acordo com o processamento aplicado e durante a torrefação pode estar relacionado com a produção de compostos voláteis (SELMAR et al., 2015). Neste estudo, os altos níveis foram correlacionado aos cafés fermentados em biorreatores. Baixos níveis de ácido clorogênico foram relatados por De Bruyn e colaboradores (2017), em cafés processados pela via natural, os autores relacionaram que a aeração lenta e posterior redução da umidade podem ter contribuído para a degradação do ácido clorogênico por enzimas endógenas. Esse fator pode ter contribuído para os baixos níveis de sacarose no controle.

Os níveis de ácido lático foram mais altos na fermentação conduzidas em biorreatores (Figura 4), como esperado, com base na população de bactérias ácido lácticas (Tabela 3) e em sua diversidade de espécie presente (Figura 1). Bactérias ácido-láticas como *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (EVANGELISTA et al., 2015; LEONG et al., 2014; SCHILLINGER et al., 2008; HADIPERNATA; NUGRAHA, 2018) podem ter contribuído para

este fato. Os biorreatores fornecem baixa disponibilidade de oxigênio o que favorece o crescimento de bactérias ácido-láticas e a produção do ácido lático (AVALLONE et al., 2002; BRESSANI et al., 2018; WANG et al., 2019). A presença do ácido lático auxilia na acidificação sem afetar a qualidade, uma vez que acidificação eleva a qualidade da bebida final (PEÑUELA-MARTÍNEZ; ZAPATA-ZAPATA; DURANGO-RESTREPO, 2018), sendo a acidez é um indicador de qualidade (SILVA et al., 2008; SUNARHARUM; WILLIAMS; SMYTH, 2014).

A glicose apresentou altos níveis no controle (Figura 4) enquanto baixos níveis foram detectados no café fermentado. Uma possível explicação para baixos níveis de glicose em cafés fermentados, pode estar relacionado com a alta atividade microbiana, a contagem populacional máxima atingiu 9,17 log UFC/g. Em processamento seco e semi-seco sem fermentação em sistemas fechados com indução a anaerobiose, a contagem máxima atingiu entre 4 e 5 log UFC/g e entre 7 e 8 log UFC/g, respectivamente (EVANGELISTA et al., 2014a; EVANGELISTA et al., 2014b). Os açúcares como a glicose podem ser utilizados pelos microrganismos, assim, diminuindo a disponibilidade (SILVA et al., 2008; JACKELS; JACKELS, 2005). O processamento pode afetar a concentração da glicose (KNOPP; BYTOF; SELMAR, 2006). Além disso, a ausência de condições anóxicas favorecem concentrações superiores de monossacarídeos livres em café verde (DE BRUYN et al., 2017). Logo, biorreatores com indução a anaerobiose podem ter contribuído para os baixos níveis da glicose no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a glicose nos grãos fermentados em biorreatores.

Sabe-se que o perfil químico do café é influenciado por fatores pré e pós colheita, no entanto o perfil químico do grão torrado ainda pode apresentar informações metabólicas do fruto e manter informações sobre a origem geográfica (SANTOS; ALVARENGA; BOFFO, 2020). Infere-se que a variedade e as condições na região Sul de Minas em Carmo de Minas pode estar relacionado com a separação das demais cidades, tendo em vista que a cidade de Carmo de Minas difere-se pela variedade (Bourbon Amarelo) e sua altitude superior (1.161 m). Os compostos químicos que contribuíram para essa diferenciação foram o ácido clorogênico e ácido quínico. O ácido clorogênico apresenta propriedade antioxidante (OESTREICH-JANZEN, 2010). O ácido quínico é um dos produtos de degradação do ácido clorogênico e pode estar relacionado com amargor (WEI et al., 2014; GINZ et al., 2000; JAISWAL et al., 2012; SHIBAMOTO, 2015). Diferenças dos teores de ácido clorogênico e ácido quínico em grão torrado entre distintas cultivares foi relatado por Kitzberger e colaboradores (2017).

As curvas de TDS variaram com a região e com o tipo de processamento pós colheita realizado. Assim, os distintos atributos para cada processo e tratamento permitiu variedade de atributos quanto a escolha do consumidor em relação a preferência. Diferenças sensoriais entre

regiões foram encontradas e a presença da diversidade de espécies em cada fazenda pode ter influenciado devido a produção de compostos voláteis (EVANGELISTA et al., 2015). A bebida final de café caracteriza-se por apresentar complexidade de sabores (EVANGELISTA et al., 2014a; EVANGELISTA et al., 2014b).

Dentre as regiões estudadas, a maior diversidade de bactérias ácido-láticas foi detectada no café natural no Cerrado e no café descascado em Matas de Minas, curiosamente os atributos caramelo e chocolate foram dominantes e específicas nas respectivas regiões. *Pichia kluyveri* foi detectada somente no café descascado em Matas de Minas e pode estar relacionado ao atributo chocolate. *Saccharomyces cerevisiae* foi detectada em predominância e em 100% de abundância no café natural no cerrado e pode estar relacionado com o atributo caramelo. A dominância do atributo frutado foi comum na região Mata de Minas no café natural e no Sul de Minas em Três Pontas no café descascado e em ambas as regiões foi detectado maior contagem populacional de bactérias mesofílicas. Na cidade Carmo de Minas no café natural mais atributos foram detectados em dominância (Frutado e açúcar caramelizado) concomitantemente foi detectado maior contagem populacional de leveduras (6,30 log UFC/g). No café descascado também foi detectado contagem populacional superior de leveduras (4,59 – 4,97 log UFC/g) e maior diversidade de espécies de leveduras, todos os atributos foram percebidos. A população de microrganismos influenciou o perfil sensorial, contudo, o uso de biorreatores modulou a percepção sensorial devido à alta população microbiana. Nos cafés fermentados em biorreatores foi detectado maior diversidade de atributos em relação ao controle.

## Conclusão

A diversidade e abundância da microbiota dominante foi conhecida nos cafés fermentados em biorreatores em cada região produtora de café do estado de Minas Gerais, Brasil. A condução da fermentação em sistema de batelada fechado, sem adição de água e anaerobiose induzida impactou o perfil microbiológico, químico e sensorial. Dentre os grupos microbianos estudados, as bactérias foram as dominantes durante todo o processo fermentativo conduzido nos biorreatores. A diversidade em cada fazenda indicou uma microbiota específica para a região geográfica e influenciou nos sabores. A diversidade de leveduras forneceu informações importantes sobre possíveis culturas iniciadoras para serem utilizadas nas diferentes regiões. A microbiota apresentou comportamento diferente nas distintas variedades, devido as diferentes altitudes e condições de fermentação como a temperatura que variou nas regiões. As regiões, altitude e temperatura alteraram a diversidade e qualidade do café. Na região Sul de Minas localizada a 1.161 m de altitude apresentou maior contagem populacional de leveduras e mais atributos foram percebidos em dominância durante a análise sensorial. O café descascado apresentou população máxima e maior diversidade de leveduras e todos os atributos foram percebidos. Dentre os cafés descascados maior diversidade de leveduras foi detectada na região Sul de Minas em Três Pontas, o atributo cana-de-açúcar foi detectado em dominância apenas nesta cidade. A análise pela espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu a caracterização química dos cafés fermentados, sendo o ácido láctico detectado em altos níveis. Nos cafés fermentados em biorreatores, mais compostos químicos precursores de qualidade foram relacionados aos grãos de café verde. Maior diversidade de atributos foram percebidos em café fermentados em biorreatores.

## REFERENCIAS

- AGATE, A. D.; BHAT, J. V. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. **Appl. Microbiol.**, n. 14 v. 2, p. 256-260, 1966.
- ANASTASIADOU, S.; PAPAGIANNI, M.; FILIOUSIS, G.; AMBROSIADIS, I.; KOIDIS, P. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 448-454, 2008.
- AVALLONE, S.; BRILLOUET, J. M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J. P. . Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 191-198, 2002.
- BAGENDA, D. K.; HAYASHI, K.; YAMAZAKI, K.; KAWAI, Y. Characterization of an antibacterial substance produced by *Pediococcus pentosaceus* Iz3.13 isolated from Japanese fermented marine food. **Fisheries Science**, n. 2, v. 74, p. 439-448, 2008.
- BARBOSA, J. N.; BORÉM, F., CIRILLO, M. A.; MALTA, M. R.; ALVARENGA, A. A.; ALVES, H. M. R. Coffee Quality and Its Interactions with Environmental Factors in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, n. 5, v. 4, 2012.
- BRANDO, C. H. J.; BRANDO, M. F. P. Methods of coffee fermentation and drying. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Ed.). *Cocoa and Coffee Fermentations*. Florida, EUA: CRC, Press, Taylor & Francis Group. p. 341-365, 2015.
- BRESSANI, A. P. P.; MARTINEZ, S. J.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 212-219, 2018.
- BRESSANI, A. P. P.; MARTINEZ, S. J. ; SARMENTO, A. B. I.; BORÉM, F. M. ; SCHWAN, R. F. Organic acids produced during fermentation and sensory perception in specialty coffee using yeast starter culture. **Food Research International**, v. 128, 2020.
- BORÉM, F. M. **Pós colheita do café**. Lavras: UFLA. p. 630, 2008.
- BORÉM, F. M.; FIGUEIREDO, L. P.; RIBEIRO, F. C.; TAVEIRA, J. H. S.; GIOMO G. S.; SALVA, T. J. G. The relationship between organic acids, sucrose and the quality of specialty coffees. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 8, p. 709-717, 2016.
- COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, n. 1, v. 189, p. 81-87, 2000.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de café – Quarto levantamento Dezembro/2019. 2019.
- DA SILVA, L. A. FLUMIGNAN, D.; PEZZA, H.; PEZZA, L. 1H NMR spectroscopy combined with multivariate data analysis for differentiation of Brazilian lager beer according to brewery. **European Food Research and Technology**, n. 11, v. 245, p.2365-2372, 2019.

- DE BRUYN, F.; ZHANG, S. J.; POTHAKOS, V.; TORRES, J.; LAMBOT, C.; MORONI, A. V.; CALLANAN, M. SYBESMA, W.; WECKX, S.; VUYST, DE L. Exploring the Impacts of Postharvest Processing on the Microbiota and Metabolite Profiles during Green Coffee Bean Production. **Applied and environmental microbiology**, n. 1, v. 83, 2017.
- DE CARVALHO NETO, D. P.; DE MELO, G. V.; DE CARVALHO, J. C.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. High-throughput rRNA gene sequencing reveals high and complex bacterial diversity associated with Brazilian coffee bean fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, n. 1, v. 56. p. 90-96, 2018.
- DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. F. A.; WERNECK, C. C. Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. **Food Chemistry**, v. 50, p. 141-145, 1994.
- DE OLIVEIRA JUNQUEIRA, A. C.; DE MELO, G. V.; CORAL MEDINA, J. D.; ALVEAR, M. C. R.; ROSERO, R.; DE CARVALHO NETO, D. P.; ENRÍQUEZ, H. G.; SOCCOL, C. R. First description of bacterial and fungal communities in Colombian coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. **Scientific Reports**, n.1, v.9, p.8794, 2019.
- DEVEREUX, R.; WILLIS, S. G. **Molecular Microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 1995.
- ELHALIS, H.; COX, J.; ZHAO, J. Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of Australian coffee beans. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 32, 2020.
- EVANGELISTA, S. R.; DA CRUZ PEDROZO MIGUEL, M. G.; DE SOUZA CORDEIRO, C.; SILVA, C. F.; MARQUES PINHEIRO, A. C.; SCHWAN, R. F. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. **Food Microbiology**, v.44, p. 87-95, 2014a.
- EVANGELISTA, S. R.; SILVA, C. F.; MIGUEL, M. G. P. DA C.; CORDEIRO, C. DE S.; PINHEIRO, A. C. M.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. **Food Research International**, v. 61, p. 183-195, 2014b.
- EVANGELISTA, S. R.; MIGUEL, DA CRUZ PEDROSO, M. G.; SILVA, C. F.; PINHEIRO, A. C. M.; SCHWAN, R. F. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 102-112, 2015.
- FAGAN, E. B.; SOUZA, C. H. E.; PEREIRA, N. M. B.; MACHADO, V. J.. Effect of time on coffee bean (*Coffea* sp) growth in cup quality. **Bioscience Journal**, n. 5, v. 27, p. 729-738. 2011.
- FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant Physiol**, vol.18, n.1, 2006.
- FENG, X. DONG, H., YANG, P.; YANG, R.; LU, J.; LV, J.; SHENG, J. Culture-Dependent

and -Independent Methods to Investigate the Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. **Current Microbiology**, n. 2, v. 73, p. 190-195, 2016.

FLAMENT, I. **Coffee Flavor Chemistry**. Chichester: J. Wiley, 2002.

GINZ, M.; BALZER, H. H.; BRADBURY, A. G. W.; MAIER, H. G. Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. **European Food Research and Technology**, n. 6, v. 211, p. 404-410, 2000.

HADIPERNATA, M.; NUGRAHA, S. **Process technology of luwak coffee through bioreactor utilization**. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais.**, n. 1, v. 102, 2018.

HAILE, M.; KANG, W. H. Antioxidant activity, total polyphenol, flavonoid and tannin contents of fermented green coffee beans with selected yeasts. **Fermentation**, n. 1, v. 5, 2019.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**, p. 13–30. Wiley Blackwell, 2014.

**IBGE**, Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. 2010. Disponível em: <[http://www.metadados.geo.ibge.gov.br/geonetwork\\_ibge/srv/por/metadata.show?uuid=db6696fb-9f6a-4a1f-bfae-b428d1af0f72](http://www.metadados.geo.ibge.gov.br/geonetwork_ibge/srv/por/metadata.show?uuid=db6696fb-9f6a-4a1f-bfae-b428d1af0f72)> Acesso em: out. 2019.

**ICO**. Organização Internacional do Café. 2019. Disponível em: <<http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf>>. Acesso em: out. 2019.

JACKELS, S. C.; JACKELS, C. F. Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators: A field study in Nicaragua. **Journal of Food Science**, n.5, v. 50, 2005.

JAISWAL, R.; MATEI, M. F.; GOLON, A.; WITT, M.; KUHNERT, N. Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. **Food and Function. Anais**. n. 9, v. 3, 2012.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, n. 3, v. 5, 2010.

KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B.; SILVA, J. B. G. D.; BENASSI, M. T. Diversity of Organic Acids Content in green and roasted *Coffea Arabica* cultivars. In: **Organics Acids: Characteristics, Properties and Synthesis**, New York: Nova, Cap. 3, p. 73-90, 2017.

KO, B. K.; AHN, H. J.; BERG, F. V.; LEE, C. H.; HONG, Y. S. et al. Metabolomic insight into soy sauce through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 15, v. 57, p. 6862-6870, 2009.

KNOPP, S.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. **European Food Research and Technology**, v. 223, p.195–201, 2006.

KWON, Dae-Joong; JEONG, Hee-Jeong; MOON, Hyeyoung; KIM, Hak-Nam; CHO, Jee-Hyun; LEE, Jang-Eun; HONG, Kwan Soo; HONG, Young-Shick. Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics approach. **Food Research International**, v. 67, p. 175-182, 2015.

KREUML, M. T. L.; MAJCHRZAK, D.; PLOEDERL, B.; KOENIG, J. Changes in sensory quality characteristics of coffee during storage. **Food Science and Nutrition**, n. 4, v.1, p.267-272, 2013.

LEE, L. W.; CHEONG, M. W.; CURRAN, P.; YU, B.; LIU, S. Q. Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**, v. 185, p. 182-192, 2015.

LEONG, K.; CHEN, Y.; PAN, S.; CHEN, J.; WU, H.; CHANG, Y.; YANAGIDA, F. Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. **Current Microbiology**, v. 68, p. 440-447, 2014.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. Analytical strategies in metabolomics. **Journal of Proteome Research**, n. 2, v.6, p. 443- 458, 2007.

LIMA-NETO, R.; SANTOS C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAIS, C.; NEVES R. P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolate culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

MAINAR, M. S.; STAVROPOULOU, D. A.; LEROY, FRÉDÉRIC. Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, v. 17, p. 24-37, 2017.

MARTINEZ, S. J.; BRESSANI, A. P. P. ; MIGUEL, M. G. DA CRUZ PEDROZO ; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. **Food Research International**, v.102, p.333-340, 2017.

MARTINEZ, S. J. ; BRESSANI, A. P. P. ; DIAS, D. R. ; PAVESI, J.; SCHWAN, R. F. Effect of Bacterial and Yeast Starters on the Formation of Volatile and Organic Acid Compounds in Coffee Beans and Selection of Flavors Markers Precursors During Wet Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 10:1287-13, 2019.

MARTINS, P. M. M.; BATISTA, N. N.; MIGUEL, M. G. DA C. P.; PAVESI, J. B.; SOARES, S. J. R.; SCHWAN, R. F. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. **Food Research International**, v. 129 2020.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, v. 21, n. 7, p. 549-556, May 2004.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 291-296, 2006a.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*, v 106, n 2, p. 229-234, 2006b.

NAMANJA, A. T.; XU, J.; WU, H.; SUN, Q.; UPADHYAY, A.K.; SUN, C. ;VAN DOREN, S.R. ;PETROS, A.M. NMR-based fragment screening and lead discovery accelerated by principal component analysis. **Journal of Biomolecular NMR**, n. 12, v. 73, p. 675-685, 2019.

NIELSEN, D.S.; TENIOLA, O.D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON T.S.; HOLZAPFEL, W.H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 114, p. 168-186. 2007.

NUNES, C. A.; PINHEIRO, A. C. M. **SensoMaker**, version 1.8. UFLA, Lavras, 2012.

OESTREICH-JANZEN, S. **Chemistry of Coffee**. In: M. LEW , L. HUNG-Wen. *Comprehensive natural products II* , vol. 3, Elsevier , Oxford , pp. 1085 – 1117, 2010.

OHNO, A.; SAMUKA, C.; OKUDA, H.; FUKUHARA, K. Characterization of tea cultivated at four different altitudes using <sup>1</sup>H NMR analysis coupled with multivariate statistics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 10, v. 59, p. 5181-5187, 2011.

OLIVEIRA, S. D.; FRANCA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A; BORGES, M. L. A. The effect of roasting on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. **Food Chemistry**, v. 90, p. 287- 291, 2005.

PALERMO, J. R. **Análise sensorial: Fundamentos e métodos**. 1 ed. Atheneu. 2015.

PINEAU, N.; SCHLICH, P.; CORDELLE, S.; MATHONNIÈRE, C.; ISSANCHOU, S.; IMBERT, A.; ROGEAUX, M.; ETIÉVANT, P.; KOSTER, E. Temporal Dominance of Sensations: Construction of the TDS curves and comparison with time–intensity. **Food Quality and Preference**, v. 20, n. 6, p. 450-455, Sep. 2009.

PEÑUELA-MARTÍNEZ, A. E.; ZAPATA-ZAPATA, A. D.; DURANGO-RESTREPO, D. L. Performance of different fermentation methods and the effect on coffee quality (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, n. 4, v. 13, p. 465-476, 2018.

RIBEIRO, L. S.; MIGUEL, M. G. DA C. P.; EVANGELISTA, S. R.; MARTINS, P. M. M.; VAN MULLEM, J. ; BELIZARIO, M. H.; SCHWAN, R. F. Behavior of yeast inoculated during semi-dry coffee fermentation and the effect on chemical and sensorial properties of the final beverage. **Food Research International**, v.92, p.26-32, 2017.

RIBEIRO, L. S.; EVANGELISTA, S.; MIGUEL, M.; MULLEM, J.; SILVA, C.; SCHWAN, R. Microbiological and chemical-sensory characteristics of three coffee varieties processed by wet fermentation. **Annals of Microbiology**, n. 10, v. 68, p. 705-716, 2018.

SADISHKUMAR, V.; JEEVARATNAM, K. Purification and partial characterization of antilisterial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* KJBC11 from Idli batter fermented with Piper betle leaves. **Journal of Food Biochemistry**, n. 1, v. 42, 2018.

SANTOS PIMENTA, L. P.; SCHILTHUIZEN, M.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Quantitative analysis of amygdalin and prunasin in *Prunus serotina* Ehrh. using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. **Phytochemical Analysis**, n. 2, v. 25, p.122-126 2014.

SANTOS, H. D.; ALVARENGA, Y. A.; BOFFO, E. F. H NMR metabolic fingerprinting of Chapada Diamantina/Bahia (Brazil) coffees as a tool to assessing their qualities. **Microchemical Journal**, v. 152, 2020.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M.; BYTOF, G. Metabolic responses of coffee beans during processing and their impact on coffee flavor R.F. Schwan, G.H. Fleet (Eds.), **Cocoa and coffee fermentations**, CRC Press, New York, p. 431-476, 2015.

SCA - Specialty Coffee Association of America. 2019. Disponível em <<http://www.scaa.org>> (Accessed at: out. 2019).

SCHWAN R. F; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. IN: T. BOEKHOUT, V. ROBERT (Ed), **Yeasts in food**, Behr's Verlag, Germany, pp. 429-449, 2003.

SCHILLINGER, U. SCHILLINGER, U.; BOEHRINGER, B.; WALLBAUM, S.; CAROLINE, L. ; GONFA, A. ; HUCH (NÉE KOSTINEK), M. ; HOLZAPFEL, WILHELM H.; FRANZ, CHARLE,S M. A. P A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, n. 2, v. 286-292, 2008.

SHIBAMOTO, T. **Volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components** V. R. Preedy (Ed.), *Coffee in health and disease prevention*, Elsevier, London pp. 129-135, 2015.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; SOUSA DIAS, E.; WHEALS, A. E. I. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. n.2, v 60, p 251-260, 2000.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, n. 8, v. 25, p. 951-957, 2008.

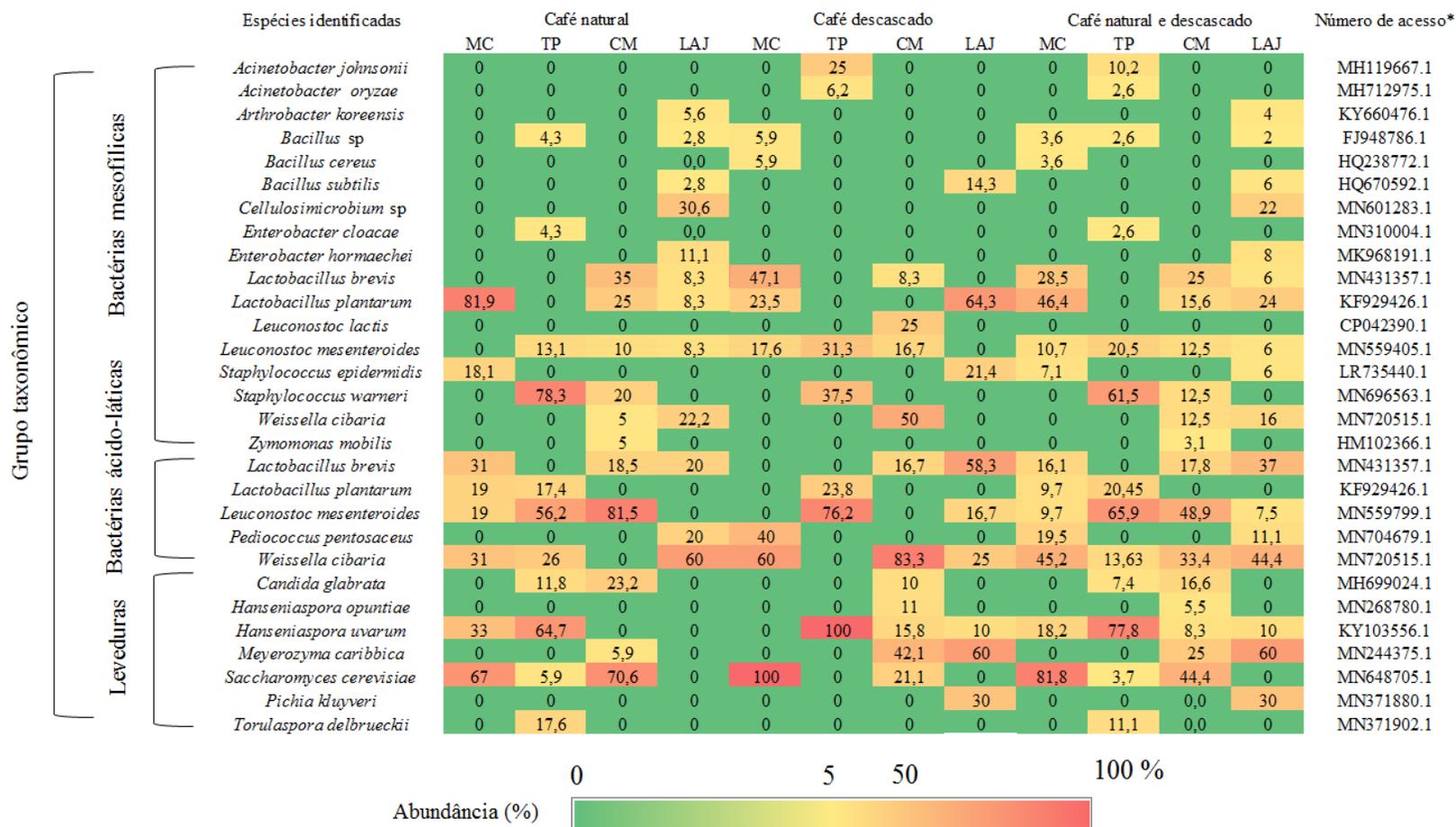
SILVA, C. F.; VILELA, D. M.; CORDEIRO, C. de S.; DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 2, v. 29, p. 235-247, 2013.

SON, H. S.; KIM, K. M.; VAN DEN BERG, F.; HWANG, G. S.; PARK, W. M.; LEE, C. H.; HONG, Y. S. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 17, v. 56, p. 8007-8016, 2008.

- SUNARHARUM, W. B.; WILLIAMS, D. J.; SMYTH, H. E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. **Food Research International**, v. 62, p. 315-325, 2014.
- TOLESSA, K.; ALEMAYEHU, D.; BELEW, D.; BOECKX, P. Biochemical composition of Ethiopian coffees (*Coffea arabica* L.) as influenced by variety and postharvest processing methods. **African Journal of Food Science**, v. 13, n. 2, p. 48-56, 2019.
- VELMOUROUGANE, K. Impact of Natural Fermentation on Physicochemical, Microbiological and Cup Quality Characteristics of Arabica and Robusta Coffee. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section**, v.83, n. 2, p.233-239, 2013.
- VIANI, R.; HORMAN, I. Thermal behavior of trigonelline. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 6, 1974.
- VIDHYASAGAR, V.; JEEVARATNAM, K. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. **Journal of Functional Foods**, n. 1, v. 5, p. 235-243, 2013.
- VILELA, D. M.; PEREIRA, G. V. DE M.; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. S. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, n. 8, v. 27, p. 1128-1135, 2010.
- WANG, C.; SUN, JINGCAN ; LASSABLIERE, B.; YU, B.; ZHAO, F.; ZHAO, F.; CHEN, Y.; LIU, S. Q. Potential of lactic acid bacteria to modulate coffee volatiles and effect of glucose supplementation: fermentation of green coffee beans and impact of coffee roasting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 1, v. 99, p.409-420, 2019.
- WEI, F.; FURIHATA, K.; HU, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. . **Magnetic Resonance in Chemistry**, n. 11, v. 48, p.857-865, 2010.
- WEI, F. FURIHATA, K.; KODA, M.; HU, FANGYU; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: Time course of changes in composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n. 4, p.1005-1012, 2012.
- WEI, F.; FURIHATA, K.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. A pilot study of NMR-1152 based sensory prediction of roasted coffee bean extracts. **Food Chemistry**, v. 152, p. 363-369, 2014.
- WENDLER, R.; VEITH, R.; DANCER, J.; STITT, M.; KOMOR, L. Sucrose storage in cell suspension cultures of *Saccharum* sp. (sugarcane) is regulated by a cycle of synthesis and degradation. **Planta**, n. 183, p. 31–39, 1990.
- YANG, NI.; LIU, C.; LIU, X.; DEGN, T. K.; MUNCHOW, M.; FISK, I. Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects. **Food Chemistry**. v. 211, p. 206–214, 2016.

## ANEXO 1. Material complementar

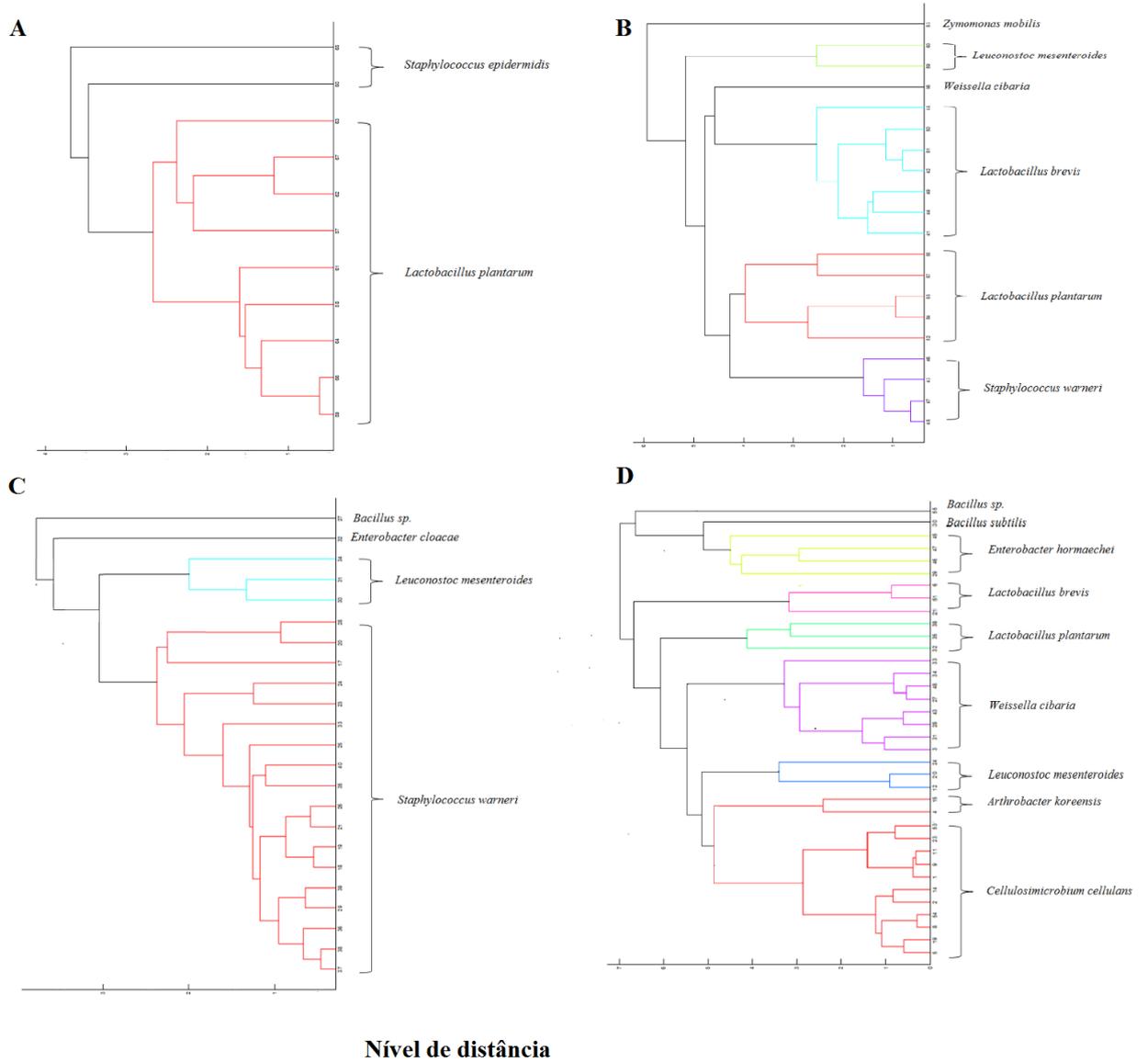
**Figura 1** - Heatmap dos isolados (%) das espécies de bactérias e leveduras presentes no café natural e descascado no T1 de fermentação conduzida em sistema de batelada fechado, sem adição de água e anaerobiose induzida biorreatores, identificadas pelo sequenciamento. A escala mostrada no final da imagem.



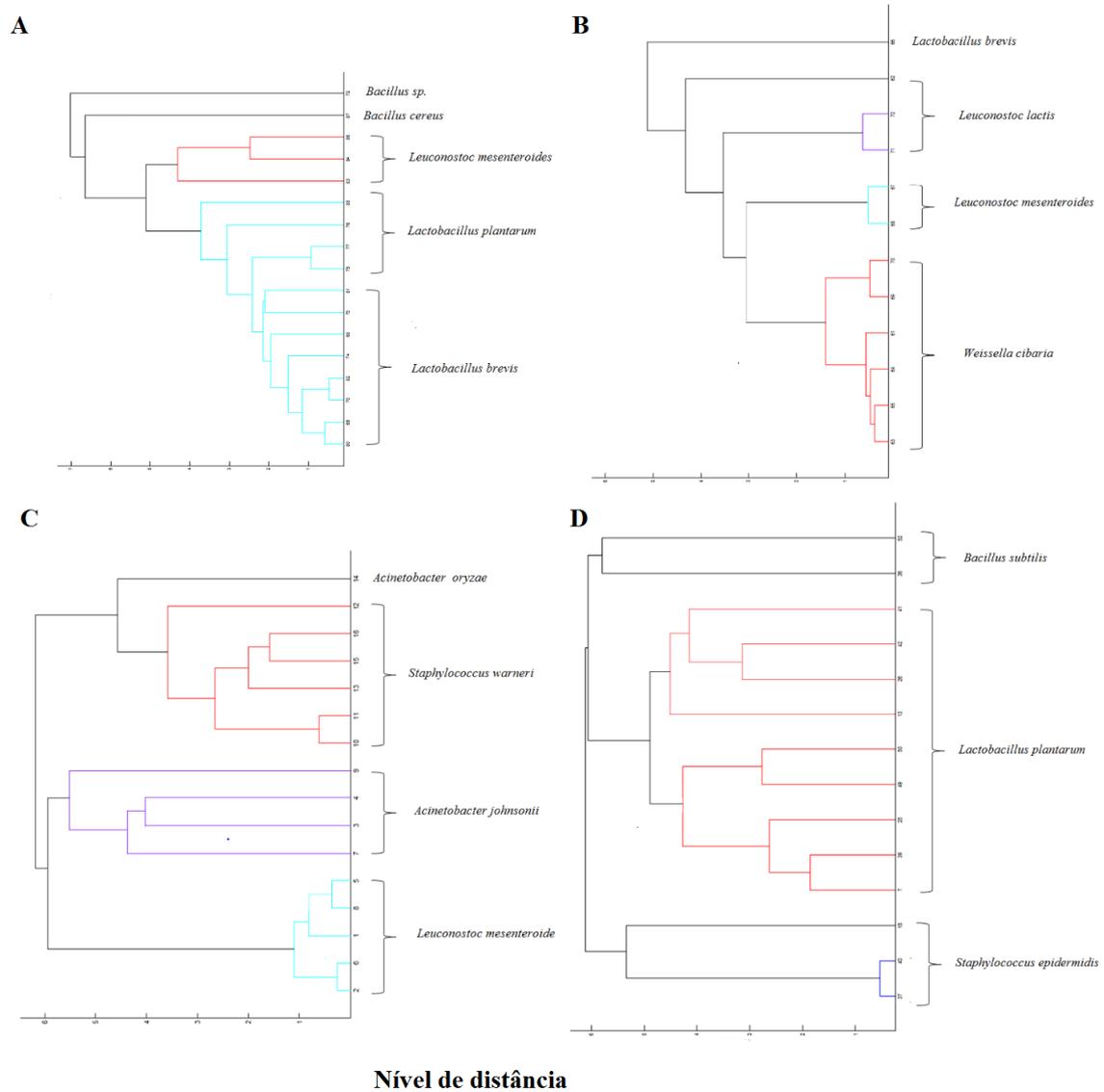
\*Número de acesso ao banco de dados Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);

MC: Monte Carmelo (Cerrado); TP: Três Pontas (Sul de Minas); CM: Carmo de Minas (Sul de Minas); LAJ: Lajinha (Matas de Minas).

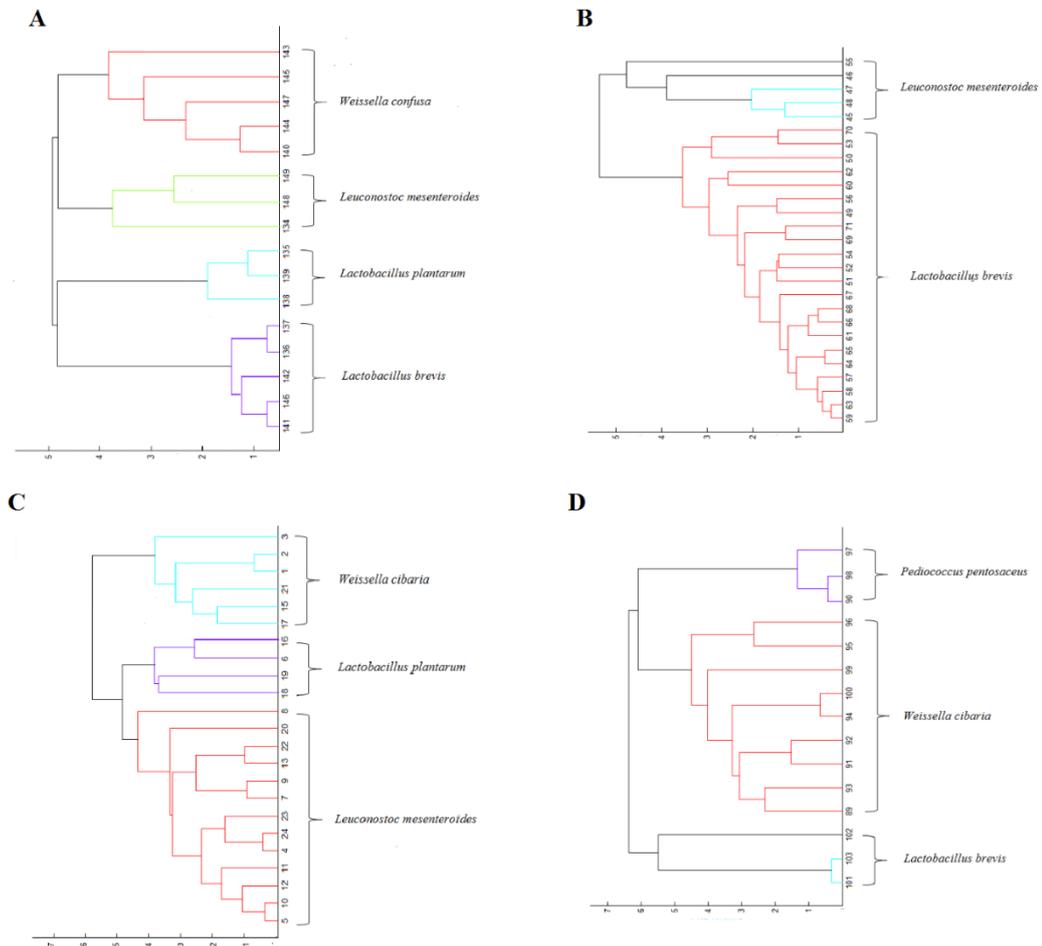
**Figura 1** - Dendograma obtido por análise de agrupamento dos espectros de referência MALDI-TOF MS das bactérias mesofílicas no café natural. A Monte Carmelo. B Carmo de Minas. C Três Pontas. D Lajinha.



**Figura 2** - Dendograma obtido por análise de agrupamento dos espectros de referência MALDI-TOF MS das bactérias mesofílicas no café descascado. A Monte Carmelo. B Carmo de Minas. C Três Pontas. D Lajinha

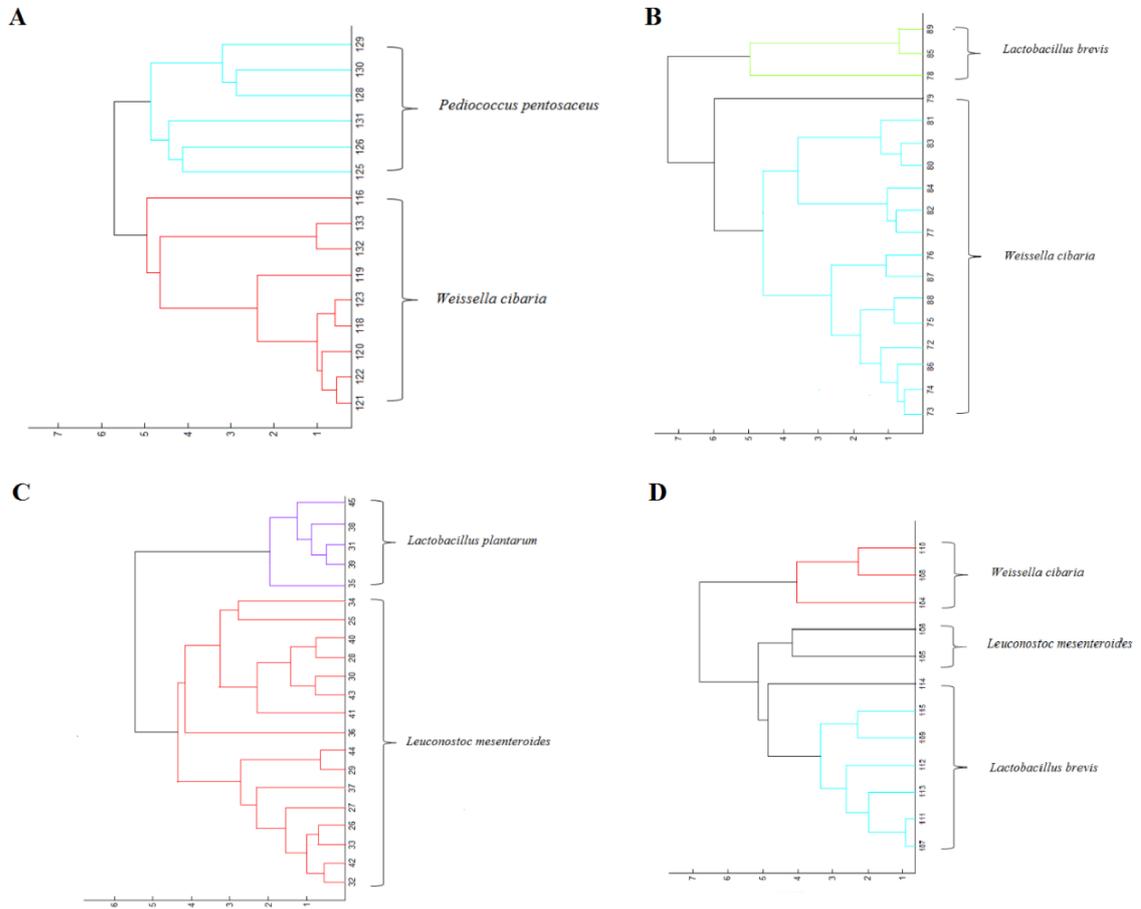


**Figura 3** - Dendrograma obtido por análise de agrupamento dos espectros de referência MALDI-TOF MS das bactérias ácido-láticas no café natural. A Monte Carmelo. B Carmo de Minas. C Três Pontas. D Lajinha



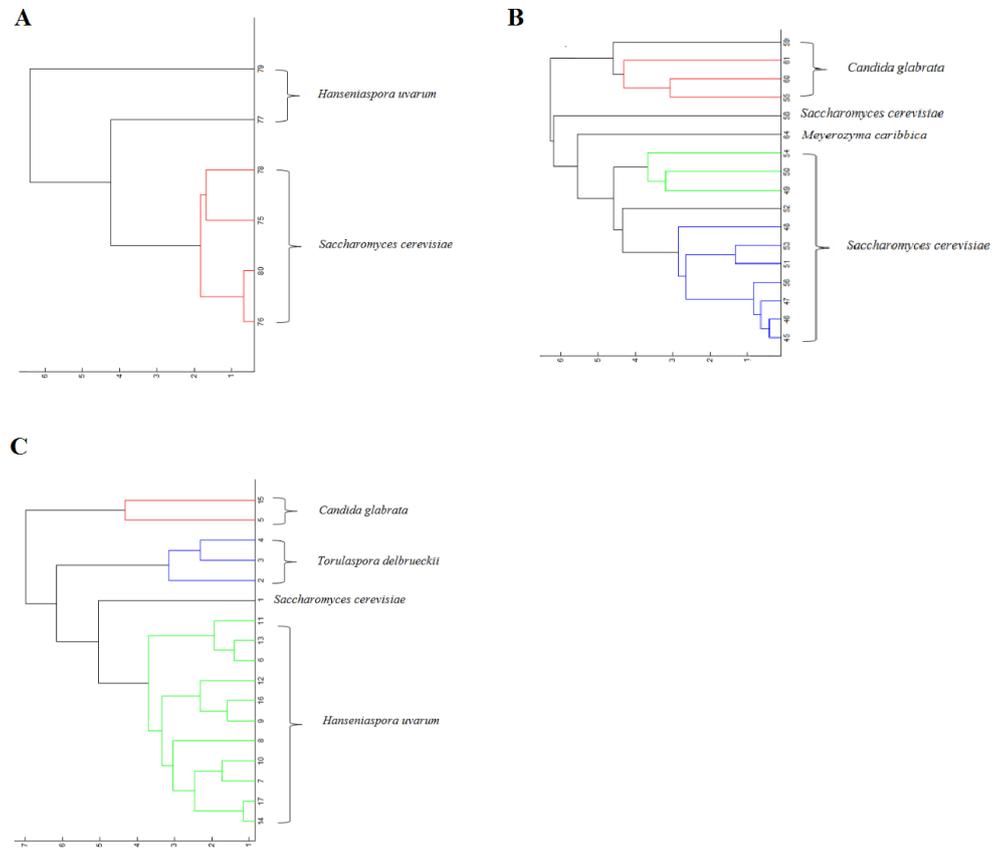
Nível de distância

**Figura 4** - Dendograma obtido por análise de agrupamento dos espectros de referência MALDI-TOF MS das bactérias ácido-láticas no café descascado. A Monte Carmelo. B Carmo de Minas. C Três Pontas. D Lajinha



**Nível de distância**

**Figura 5** - Dendograma obtido por análise de agrupamento dos espectros de referência MALDI-TOF MS das leveduras no café natural. A Monte Carmelo. B Carmo de Minas. C Três Pontas.



**Figura 6** - Dendograma obtido por análise de agrupamento dos espectros de referência MALDI-TOF MS das leveduras no café descascado. A Monte Carmelo. B Carmo de Minas. C Três Pontas. D Lajinha

